



Reglering av HSF1, HSF2 och värmechockresponsen vid oxidativ stress

Caroline Haldin-Breitenstein

Matrikelnummer: 35808

E-post: cahaldin@abo.fi

Praktisk handledare: FM Samu Himanen

Handledare: Professor Lea Sistonen,
Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Pro Gradu 223996.0, 40 sp

Utbildningsprogrammet i cellbiologi
Fakulteten för naturvetenskaper och teknik
Åbo Akademi
24.04.2020

ÅBO AKADEMI UNIVERSITY – FACULTY OF SCIENCE AND ENGINEERING

Abstract

Subject: Cell biology
Author: Caroline Haldin-Breitenstein
Title of the work: Regulation of HSF1, HSF2 and the heat shock response during oxidative stress
Supervisor: Lea Sistonen
<p>Abstract:</p> <p>The heat shock response, regulated by heat shock factors, is a highly conserved mechanism acting to maintain protein stability during cell stress. HSF1 and HSF2, members of the heat shock transcription factor family, activates transcription of chaperones like Hsp70 upon heat shock, proteotoxicity and oxidative stress, among other challenging conditions. The aim of this study was to elucidate the impact of oxidative stress on the protein levels of HSF1 and HSF2 and their binding to the Hsp70 promotor on DNA. K562-cells were treated with H₂O₂ or menadione to create oxidative stress conditions, and the relative protein levels of HSF1, HSF2 and Hsp70 were compared with Western blot. Treatment with the proteasome inhibitor MG-132 was used to examine the impact of the proteasome on the protein levels of these heat shock proteins during oxidative stress.</p> <p>The results showed decreased solubility of HSF1 and HSF2 during oxidative stress, possibly due to the formation of insoluble chromatin aggregates. Oxidative stress inhibited the expected induction of Hsp70 during proteasome inhibiting, both at the mRNA and protein level, by an unknown mechanism. HSF1 and HSF2 were found to be situated at the Hsp70 promotor during oxidative stress and proteasome inhibition, however, mRNA levels of Hsp70 did not increase under these conditions. Oxidative stress seems to have an inhibitory effect on the heat shock response when the cell is exposed to several combined stresses, possibly to allow transcription of other stress related genes.</p>
Key words: cell stress, HSF1, HSF2, oxidative stress, the heat shock response
Date: 24.04.2020

ÅBO AKADEMI – FAKULTETEN FÖR NATURVETENSKAPER OCH TEKNIK

Abstrakt

Ämne: Cellbiologi
Författare: Caroline Haldin-Breitenstein
Arbetets titel: Reglering av HSF1, HSF2 och värmechockresponsen under oxidativ stress
Handledare: Lea Sistonen
<p>Abstrakt:</p> <p>Cellen har välutvecklade system för att hantera en varierande omgivning och olika typer av stress. Bland dessa skyddssystem återfinns värmechockresponsen som regleras med hjälp av värmechockfaktorerna HSF1 och HSF2, som fungerar som transkriptionsfaktorer och aktiverar transkription av chaperoner som till exempel Hsp70. Värmechockresponsen aktiveras också vid oxidativ stress. Avhandlingens syfte var att undersöka inverkan av oxidativ stress på proteinnivåerna av HSF1 och HSF2 och deras bindningsmönster till DNA. Oxidativ stress skapades i K562-celler med H₂O₂ eller menadion och de relativa proteinnivåerna jämfördes med Western blot-analys. Cellerna behandlades också med proteasominhibitorn MG-132 för att undersöka proteasomens inverkan på proteinnivåerna av HSF1, HSF2 och Hsp70.</p> <p>Oxidativ stress påverkade lösligheten av HSF1 och HSF2, eventuellt så att de bildar olösliga kromatinaggregat. Oxidativ stress inhiberade induceringen av Hsp70 vid proteasominhibering, både på mRNA- och proteinnivå via en okänd mekanism. HSF1 och HSF2 band promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering, men varken mRNA eller Hsp70-protein producerades mer än normalt, vilket var överraskande. Oxidativ stress har en inhiberande inverkan på värmechockresponsen i samband med andra stressfaktorer, eventuellt till förmån för cellens andra stresshanteringssystem.</p>
Nyckelord: cellstress, HSF1, HSF2, oxidativ stress, värmechockresponsen
Datum: 24.04.2020

Förkortningar	3
1 Inledning	4
2 Litteraturoversikt	6
2.1 Kromatinmiljön i eukaryota celler	6
2.1.1 Transkription hos eukaryoter	6
2.2 Värmechockresponsen	8
2.2.1 Värmechockfaktorerna	10
2.2.1.1 HSF1	10
2.2.1.2 HSF2	13
2.2.2 Värmechockproteinerna skyddar cellen	14
2.3 HSF1 kopplas till cancer, livslängd och neurodegenerativa sjukdomar	16
2.4 Oxidativ stress	17
2.4.1 Redoxsignalering	19
2.4.2 Oxidativ stress aktiverar värmechockresponsen	21
2.5 Oxidativ stress och sjukdomsutveckling	22
3 Målsättning	25
4 Material och metoder	26
4.1 Cellkultur och behandling	26
4.2 Lysering med buffert C och Bradford-proteinanalys	27
4.3 Western blotting	28
4.3.1 SDS-PAGE	28
4.3.2 Transfer	29
4.3.3 Immunoblotting	29
4.4 qRT-PCR	30
4.4.1 RNA-isolering	30
4.4.2 cDNA-syntes	30
4.4.3 qPCR	31
4.5 ChIP	31
4.5.1 In vivo-stabilisering av DNA-proteinkomplex med formaldehyd	32
4.5.2 Immunoprecipitering av DNA-proteinkomplex med specifika antikroppar	32
4.5.3 Nedbrytning av proteiner och RNA samt frisättning och extrahering av DNA-fragment	33
4.5.4 Detektering av immunorenat kromatin med PCR	33
4.6 Cellfraktionering	34

4.6.1 Homogenisering av K562-celler	34
4.6.2 Isolering av fraktionen med cellkärnor	34
4.6.3 Isolering av mitokondriefraktionen	34
4.6.4 Isolering av membranfraktionen och den lösliga fraktionen	35
4.6.5 Proteinanalys	35
5 Resultat	36
5.1 Lösligt HSF1 och HSF2 minskar vid oxidativ stress	36
5.2 Oxidativ stress påverkar induceringen av Hsp70-mRNA vid proteasominhibering	38
5.3 HSF1 och HSF2 binder promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering	40
5.4 HSF1 och HSF2 förflyttar sig till cellkärnan vid oxidativ stress	41
6 Diskussion	43
6.1 Oxidativ stress påverkar induceringen av Hsp70 vid proteotoxisk stress	43
6.2 Inducering av Hsp70 påverkas vid proteasominhibering och oxidativ stress trots opåverkad bindning av HSF1 och HSF2 till DNA	44
6.3 Projektets begränsningar	45
6.4 Sammanfattning	46
Tillkännagivanden	47
Appendix I - Recept	55
Appendix II - Antikroppar	56
Appendix III - Primers och prober för qPCR och ChIP	57

Förkortningar

DNA: deoxyribonukleinsyra (eng. deoxyribonucleic acid)

GSH: glutation

GSSG: glutationdisulfid

HSF: värmechockfaktor (eng. heat shock factor, HSF)

HSE: värmechockelement (eng. heat shock element)

HSF1: värmechockfaktor 1 (eng. heat shock factor 1)

HSF2: värmechockfaktor 2 (eng. heat shock factor 2)

Hsp: värmechockprotein (eng. heat shock protein)

GSR: glutationreduktas

GPx: glutationperoxidas

mtDNA: mitokondrie-DNA (eng. mitochondrial DNA)

mRNA: meddelanderibonukleinsyra (eng. messenger ribonucleic acid)

nSB: nukleära stresskroppar (eng. nuclear stress bodies)

qRT-PCR: (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

RNS: reaktiva kvävemolekyler (eng. reactive nitrogen species)

ROS: reaktiva syremolekyler (eng. reactive oxygen species)

SIRT1: sirtuin 1

SOD: superoxiddismutas

SUMO: liten ubikvitinlik modifierare

1 Inledning

Till cellens viktigaste funktioner hör proteinproduktionen och regleringen av dess olika skeden: transkriptionen, där budbärar-RNA (mRNA) avskrivs från DNA, translationen, där proteinet syntetiseras vid ribosomerna med mRNA som mall, proteinveckningen, där proteinet får sin funktionella konformation, samt post-translationella modifieringar (PTM) som ger proteinet funktionella tillägg, till exempel fosforyleringar och acetyleringar. De färdiga proteinernas stabilitet påverkar också deras funktion och livslängd. Cellen har utvecklat mekanismer för att bibehålla en proteinhomeostas, som är ett tillstånd av balans mellan proteinproduktion, proteinnedbrytning, korrekt proteinveckning samt skador orsakade av olika typer av stress. Som skydd mot olika stresstillstånd har cellen utvecklat värmechockresponsen, en evolutionärt välbevarad skyddsmekanism, som aktiveras av proteotoxiska stressignaler när cellen utsätts för olika typer av stress som till exempel förhöjda temperaturer, tungmetaller eller oxidativ stress (Morimoto, 2011).

Värmechockresponsen regleras med hjälp av värmechockfaktorer (eng. heat shock factor, HSF), och hos däggdjur finns värmechockfaktorerna 1-5 samt X och Y. HSF1 uttrycks basalt i cellen i inaktiv konformation, men aktiveras av stressignaler varefter HSF1 fosforyleras och polymeriseras samt förflyttas till cellkärnan. HSF1-oligomererna binder värmechockelement (eng. heat shock element, HSE) i promotorerna till gener som kodar för värmechockproteiner (eng. heat shock protein, Hsp) på DNA, vilket i sin tur inleder transkription av Hsp-gener (Åkerfelt et al., 2010). Detta leder till syntetisering av Hsp som fungerar som chaperoner och hjälper till vid proteinveckning i cellen, vilket förhindrar felveckning och ackumulering av skadade proteiner (Morimoto, 2011).

HSF1-bindningen till DNA är negativt reglerad via de relativa nivåerna av Hsp90 och Hsp70, och olika PTM inverkar på aktiviteten hos HSF1 (Åkerfelt et al., 2010; Morimoto 2011; Vihervaara & Sistonen, 2014). Även HSF2 (eng. heat shock factor 2), som är betydelsefull inom utvecklingsbiologi, deltar aktivt i värmechockresponsen och reglerar transkriptionen av ett flertal Hsp. Dels bildar HSF2 och HSF1 heterotrimerer som binder DNA och deltar i aktiveringen av transkriptionen av Hsp, dels har HSF2

egna målgener oberoende av HSF1 (Östling et al., 2007, Vihervaara et al., 2013). Värmechockresponsen och HSF är evolutionärt välbevarade, vilket visats av till exempel Liu et al. (1997) som visat att uttryck av humant HSF2 kan rädda fenotypen hos HSF-null *Saccharomyces cerevisiae*. Det här resultatet demonstrerar HSF2 som en reglerare av värmechockresponsen, då HSF2 i det här fallet kan ersätta jästens motsvarighet till HSF1.

Värmechockresponsen och HSF1 aktiveras också av oxidativ stress, vilket leder till uttryck av Hsp (Lee et al., 2000; Ahn & Thiele, 2003) och en bibehållen redoxbalans (Yan et al., 2002). Reaktiva syremolekyler (eng. reactive oxygen species, ROS) som orsakar oxidativ stress i cellen skapas av cellen själv under celledningen i mitokondriernas elektrontransportkedja. Cellen har därför ett antioxidantnätverk som oskadliggör ROS innan de skadar cellens proteiner. Balansen mellan antioxidanten glutation (GSH) och dess oxiderade form glutationdisulfid (GSSG) används som mått på cellens nivå av oxidativ stress. När cellen utsätts för mer ROS än dess antioxidanter kan hantera kommer ROS åt att reagera med molekyler i cellen. ROS kan till exempel oxidera DNA vilket skapar DNA-mutationer, och aktivera eller nedtysta signalräckor via oxidering av deras komponenter. Å andra sidan deltar ROS under normala förhållanden i regleringen av en mängd signalräckor som sträcker sig över olika funktioner i cellen, bland annat tillväxt, inflammationsreglering, cellcykel och apoptos (Reuter et al., 2010).

I den här pro gradu-avhandlingen har betydelsen av HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress undersökts. Det är känt att HSF1 och uttrycket av Hsp aktiveras vid oxidativ stress och att HSF1 har en skyddande inverkan på celler som utsätts för behandlingar som skapar intracellulära ROS. Inverkan av HSF2 vid oxidativ stress hade inte undersökts närmare vid projektets början. Därför undersöktes regleringen och lokaliseringen av HSF1 och HSF2, samt bindningen av HSF1 och HSF2 till målgenen Hsp70 vid oxidativ stress. För att skapa oxidativ stress i cellerna användes väteperoxid (H_2O_2), som direkt orsakar oxidativ stress, respektive menadion som bildar superoxid ($OH\bullet$).

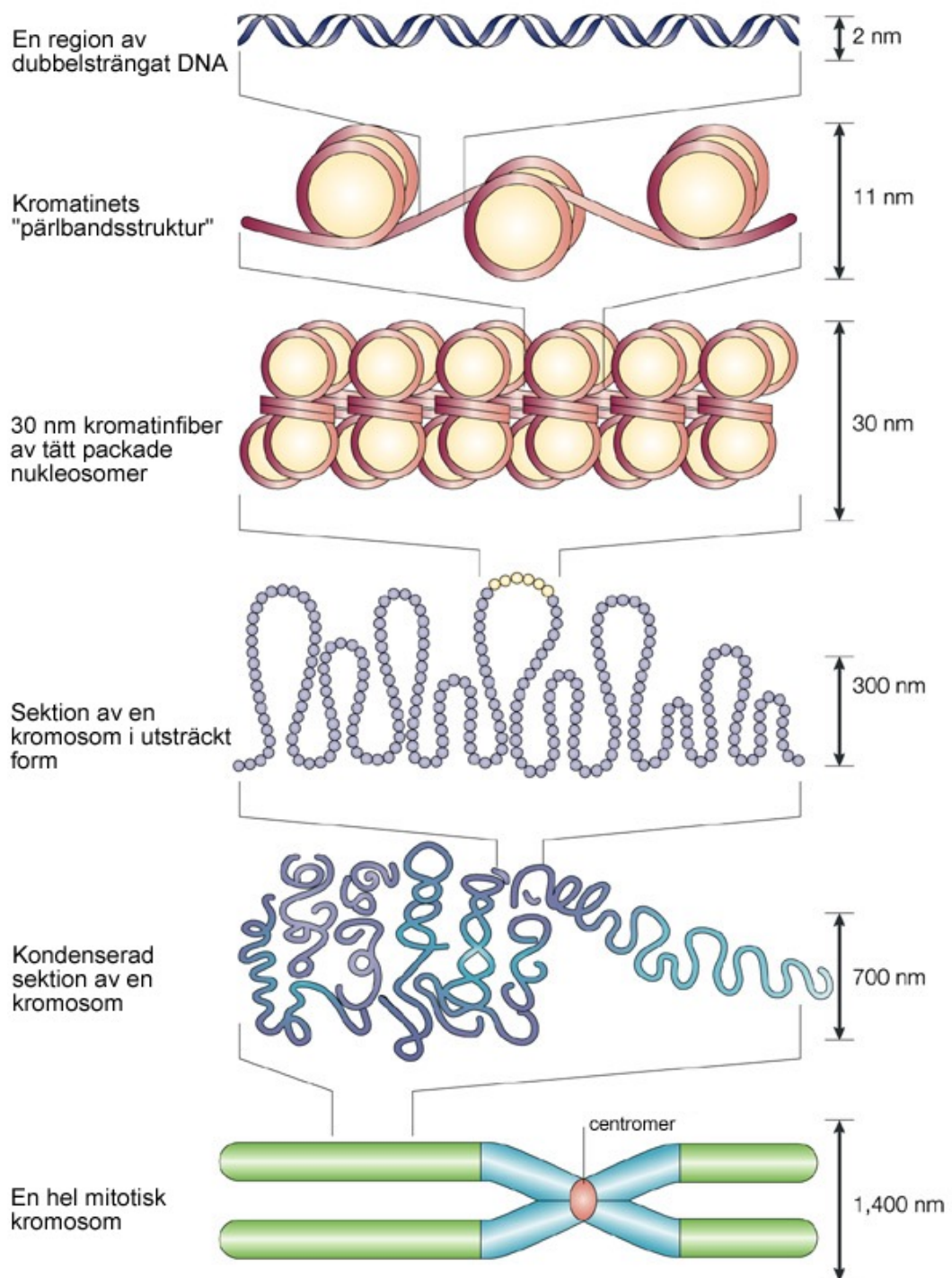
2 Litteraturöversikt

2.1 Kromatinmiljön i eukaryota celler

I cellernas DNA finns informationen för organismens proteinproduktion. Till skillnad från prokaryoter där DNA-strängen är oskyddad i cytoplasman, finns DNA hos eukaryoter i cellkärnan där det är ihoppackat som kromatin. DNA-strängen är packad runt histonproteinkomplex och tillsammans bildar de nukleosomer (figur 1). Mellan två nukleosomer finns så kallat linker-DNA som omfattar upp till 80 baspar. Nukleosomkärnan består av en oktamer av histoner: två H2A, två H2B, två H3 och två H4, och runt dessa binds 147 baspar DNA. Histoner binder det negativt laddade DNA eftersom de är positivt laddade vid aminosyrorna lysin och arginin. Nukleosomerna är tätt packade efter varandra och bildar en kromatinfiber (figur 1). Kromatinets struktur är dynamisk: en bindning mellan DNA och histoner är inte permanent, och DNA måste lösgöras från histoner och öppnas för att möjliggöra transkription, samtidigt som det finns mekanismer som packar ihop DNA för att det ska vara så skyddat som möjligt. Så kallat heterokromatin är tätt packat medan eukromatin är mer löst packat, vilket ger olika möjligheter för transkription. Kromatinets dynamik bygger bland annat på balansen mellan histonacetyltransferas (HAT) och histondeacetylaskomplex (HDAC), som acetylerar respektive tar bort acetylgrupper från lysin på histoner. När acetylgrupper läggs till på histonernas lysiner löses kromatinstrukturen upp eftersom affiniteten mellan DNA och histoner minskar då nukleosomernas positiva laddning minskar. När kromatinet löses upp attraheras specifika proteiner och genuttrycket kan aktiveras (Alberts et al., 2008).

2.1.1 Transkription hos eukaryoter

För att transkription ska kunna ske måste kromatinstrukturen och nukleosomerna lösas upp och histonerna flyttas bort från regionen som ska transkriberas, så att de proteiner som behövs för aktiveringen kan binda DNA. Genaktiverande proteiner åstadkommer detta genom att hämta ATP-beroende kromatinremodelleringskomplex och histonchaperoner till DNA. Transkriptionsfaktorer och RNA-polymeras behövs också för att transkriptionen ska kunna starta.



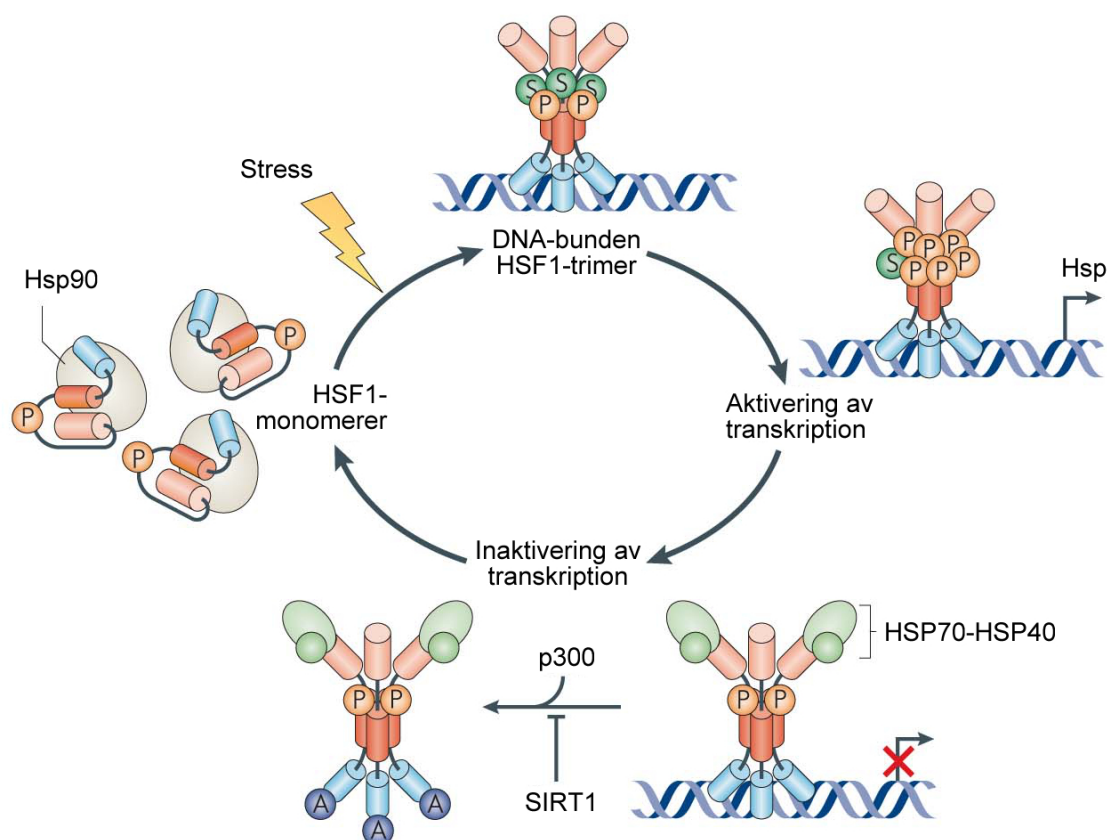
Figur 1. Kromatinstrukturen hos eukaryoter. DNA-strängen packas runt histoner i nukleosomer, som packas runt varandra till en kromatinfiber. Kromatinfibern packas ytterligare för att bilda en kondenserad kromosom. (Modifierad från Felsenfeld & Groudine, 2003)

Eukaryoter har tre RNA-polymeras: RNA-pol I, RNA-pol II och RNA-pol III, av vilka I och III transkriberar tRNA och rRNA medan II transkriberar mRNA som sedan translateras till proteiner. Det finns allmänna transkriptionsfaktorer (eng. general transcription factors, GTF) och specifika transkriptionsfaktorer. De allmänna transkriptionsfaktorerna hos eukaryoter (TFII-A, -B, -D, -E, -F, -H) behövs alltid för att transkription ska kunna starta. TFIID binder genens promotor (TATA-box) med sin underenhet TATA-bindande protein (TBP) och TBP attraherar både TFIIA och TFIIB till promotorn. TFIIF binder RNA-polymeras II och skapar ett polymeras II-komplex, som assisteras av TFIIB för att binda DNA. TFIIE och TFIIH binder komplexet och TFIIH separerar DNA-strängarna med sin ATPas- och helikasaktivitet. Den öppna DNA-strängen interagerar med RNA-pol II vilket startar transkriptionen (Alberts et al. 2008).

Transkriptionen regleras ytterligare med att RNA-pol II kan pausas ca 20-40 baspar från start och kräver fosforylering av sin karboxylterminus för att fortsätta elongeringen. Till exempel Hsp70-genen binder mer pausat än aktivt RNA-pol II, och när cellen mottar stressignaler aktiveras RNA-pol II till att starta elongeringen (Lis et al., 2000). Vid transkription av mRNA binder RNA-pol II, transkriptionsfaktorer och ett mediator-komplex till genens promotorregion, och en komplementär mRNA-sträng syntetiseras med DNA som mall. Det färdigt syntetiserade mRNA:t genomgår splitsning, där introner klipps bort och exonerna kan kombineras på olika sätt, varefter mRNA transporteras ut från cellkärnan genom en kärnpor till ribosomerna i cytoplasman eller på endoplasmatiska retiklet (ER) (Alberts et al. 2008).

2.2 Värmechockresponsen

Det är centralt för cellen att kunna anpassa sig till omgivningen och bibehålla sina funktioner vid stress. Proteiner är känsliga för förändringar i sin miljö och när cellen utsätts för till exempel värmestress, oxidativ stress eller tungmetaller leder det till obalans i cellens proteostas då proteinernas struktur och funktion förstörs (Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988). Med hjälp av värmechockresponsen kan cellen åstadkomma stressanpassning, återhämtning och överlevnad genom att producera chaperoner som tar hand om de denaturerade proteinerna (Wu, 1995; Morimoto, 1998).



Figur 2. Aktivering och inaktivering av HSF1. Under normala förhållanden är HSF1 en monomer i komplex med Hsp90. HSF1 trimeriseras, fosforyleras (P) och sumoyleras (S) vid stress, varefter trimererna binder DNA vid värmechockelement och startar transkription av värmechockproteiner (Hsp). Deacetylasen SIRT1 behåller HSF1 kompetent för DNA-bindning. Negativ återkoppling från Hsp hindrar vidare transkription, och acetylering (A) av p300 får HSF1-trimererna att släppa DNA. (Modifierad från Åkerfelt et al., 2010)

Värmechockresponsen initieras av HSF1 (Wu, 1987; Åkerfelt et al., 2010), som vid stress bildar aktiva trimerer som binder HSE-områden i promotorerna till stressrelaterade gener, vilket leder till transkription av till exempel chaperonerna Hsp70 och Hsp90 (figur 2). Regleringen av värmechockresponsen är beroende av aktiviteten hos chaperonerna Hsp70 och Hsp90, men värmechockresponsen regleras också på mRNA-nivå (Theodorakis & Morimoto, 1987). Vid stress nedregleras cellens så kallade hushållsgener, det vill säga de gener som upprätthåller cellens basala funktioner, och stressrelaterade gener prioriteras (Gidalevitz et al., 2011). Värmechockresponsen åstadkommer nedstängning av translationsprocesser samt en minskning i RNA-splitsning som berör största delen av proteomet (Labbadia & Morimoto, 2014). Translation av

proteiner pausas då det sker en sänkning i associationsnivån mellan Hsp70 och ribosomerna, där proteinerna produceras (Shalgi et al., 2014). Hsp70 skyddar bland annat nyproducerade proteiner. Det bör noteras att uttrycksmönstren vid proteotoxisk stress är olika beroende på vilken celltyp och vävnad det gäller, vilket har visats i en micro-array-studie av över 80 olika vävnader (Powers et al., 2009).

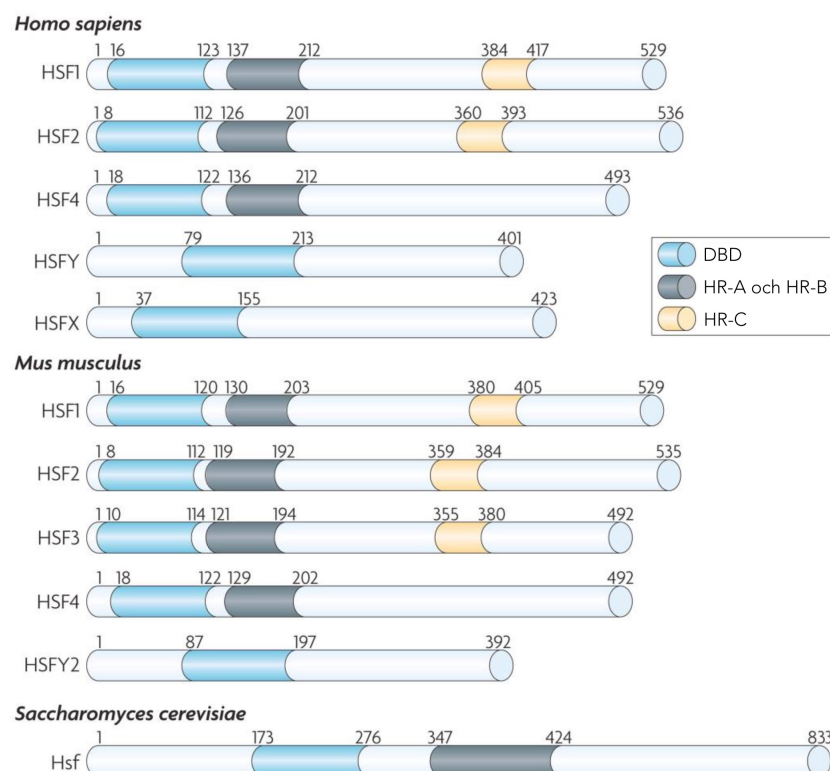
2.2.1 Värmechockfaktorerna

Värmechockresponsen observerades första gången av Ferruccio Ritossa 1962 i spottkörtlarna hos bananflugan (*Drosophila buscii*), där han iakttog puffar i kromatinet i de polytena kromosomerna vid värmechock. Puffarna innebar öppning av kromatinet och ökad transkriptionell aktivitet. HSF1 identifierades först 1984 av Parker och Topol respektive Wu et al. i *Drosophila melanogaster* via DNA-proteininteraktioner. Enligt dagens vetenskap har växter och vertebrater flera olika HSF (Nover et al., 2001), medan evertebrater har endast en. Hos däggdjur finns HSF1, HSF2, HSF3, HSF4, HSF5, HSFX och HSFY som har olika funktioner, vävnadsspecifika uttrycksmönster, interagerande proteiner samt genomgår olika PTM. Gemensamt för värmechockfaktorerna är strukturen. HSF är transkriptionsfaktorer vars DNA-bindande domän (DBD) har en vingad helix–turn–helix-struktur (Åkerfelt et al., 2010). HSF innehåller även domänerna HR-A, HR-B och HR-C som är områden med hydrofobiska heptadupprepningar. HSF binder DNA vid HSE, som består av åtminstone tre inverterade nGAAn-pentamerer, vilkas nukleotidsekvenser och ordningsföljd kan variera. Egenskapen hos HSF att kunna binda varierande nukleotidsekvenser är evolutionärt välbevarad (Vihervaara & Sistonen, 2014).

2.2.1.1 HSF1

HSF1 uttrycks basalt i de flesta celler och vävnader, och har visats nödvändig för värmetålighet och aktiveringen av Hsp-gener. Inaktivt HSF1 interagerar med Hsp70 och Hsp90, men vid stress dissocierar de och HSF1 bildar trimerer med hjälp av sina hydrofoba heptadupprepningar HR-A och HR-B (figur 3). Mellan dessa finns den reglerande domänen som behövs för att HSF1 ska aktiveras vid stress. Ytterligare en domän, HR-C, förhindrar spontan trimerisering (figur 3). HSF1-trimerer hålls inaktiva

via bindning mellan den reglerande domänen och chaperonkomplex (till exempel Hsp90, p23 och FKBP52). Transaktiveringsdomänen som finns vid karboxylterminus påverkar stressresponsens längd (Åkerfelt et al., 2010).



Figur 3. Schematisk bild av de evolutionärt bevarade domänerna på HSF. Domänerna DBD (eng. DNA binding domain), HR-A (eng. heptad repeat A), HR-B och HR-C hos människa (*Homo sapiens*) och mus (*Mus musculus*). Hsf från jäst (*Saccharomyces cerevisiae*) finns med som jämförelse. (Modifierad från Åkerfelt et al., 2010)

HSF1 är basalt uttryckt som monomer i cytosolen men är vid normala förhållanden nedtystad av interaktioner med Hsp70 och Hsp90 (Shi et al., 1998; Voellmy & Boellman, 2007), och den exakta mekanismen för aktiveringen av HSF1 är ännu inte känd. Skadade proteiner som bildas vid stress förändrar chaperonbalansen i cytoplasman och det har föreslagits att HSF1 aktiveras till följd av den här förändringen (Ananthan et al., 1986; Morimoto 1998; Voellmy & Boellman, 2007).

Detta har visats i jäst (*Saccharomyces cerevisiae*) där aktiveringen av HSF1 regleras av chaperontitrering, det vill säga tillgången på Hsp70 (Zheng et al., 2016), men

aktiveringsdomänen på HSF1 är inte evolutionärt bevarad och olika aktiveringssätt är möjliga till och med mellan olika celltyper i samma organism (Labbadia & Morimoto, 2014). HSF1 regleras av interaktioner med chaperoner, PTMs och återkopplingssystem som tillsammans bestämmer uttrycket av Hsp-gener (Gidalevitz et al., 2011). När värmechockresponsen aktiverats fungerar produktionen av Hsp70 och Hsp90 som negativ återkoppling då de binder HSF1 och förhindrar DNA-bindning, och när stressen är över tystas aktiviteten hos HSF1 ner via acetylering och bindning till chaperoner (Shi et al., 1998).

Ett flertal PTMs påverkar funktionen hos HSF1, och till dem hör åtminstone acetylering, sumoylering, fosforylering och ubikvitinering. Sumoylering och fosforylering av HSF1 sker direkt vid värmestress (Åkerfelt et al., 2010). Fosforylering av HSF1 vid stress ansågs länge aktivera HSF1 och transkriptionen av Hsp, men det har visats att fosforylering inte är nödvändig för lokalisering till kärnan eller bindning till DNA vid stress. Istället fungerar fosforyleringarna som reglerare av intensiteten hos värmechockresponsen, till exempel är gränsvärdet för aktivering av värmechockresponsen vid stress lägre då fosforyleringsställena på HSF1 är muterade (Budzyński et al., 2015). HSF1 har ett flertal fosforyleringsställena av vilka de flesta ligger i den reglerande domänen. Det finns ett experimentellt bekräftat sumoyleringsställe på HSF1: K298 som ligger inom det fosforyleringsberoende sumoyleringsmotivet (eng. phosphorylation-dependent sumoylation motif, PDSM). Fosforylering av S303 i PDSM krävs för att sumoyleringen ska ske (Hietakangas et al., 2006) och sumoyleringen tros sedan påverka de transaktiverande egenskaperna hos HSF1 via en okänd mekanism. Med masspektrometrianalys har Hendriks et al. (2017) hittat ytterligare 14 sumoyleringsställena, och de flesta ligger inom DBD eller HRA/B på HSF1.

När HSF1 acetyleras i DBD hindras bindningen till DNA. HSF1 acetyleras av acetyltransferaskomplexet p300/CBP (eng. cAMP response element-binding protein) och deacetyleras av sirtuin 1 (SIRT1). SIRT1 bibehåller HSF1 i kompetent konformation genom att förhindra acetylering, vilket förlänger bindningstiden mellan HSF1 och DNA vid Hsp70-promotorn (Westerheide et al., 2009). HSF1 nedregleras först med acetylering som förhindrar DNA-bindningen och sedan med ubikvitinering

som leder till nedbrytning av HSF1 i proteasomen (Gomez-Pastor et al., 2017). Specifika ubikvitineringsställen hos HSF1 har dock inte ännu konstaterats.

HSF1 är aktiv vid organismens utvecklingsfas och har andra målgener än Hsp. Avsaknad av HSF i *Drosophila melanogaster* orsakar störningar i oogenesen och i larvernas utveckling (Jedlicka et al., 1997) och hos möss orsakar avsaknad av HSF1 fosterdödlichkeit, tillväxtstörningar samt infertilitet hos honor (Xiao et al., 1999). Oocyter utan HSF1 är mer utsatta för oxidativ stress på grund av att deras mitokondrier är dysfunktionella, vilket leder till minskad överlevnad (Bierkamp et al., 2010). Även hjärnans utveckling påverkas av HSF1, till exempel hos möss orsakar avsaknad av HSF1 förstörade ventriklar, astroglios, neurodegeneration, myelinminskning och ackumulering av ubikvitinerade proteiner (Santos et al., 2004; Homma et al., 2007). Luktsinnets utveckling störs också allvarligt utan HSF1, då det orsakar atrofi i luktepitelet, accumulering av slem samt död bland luktsinnesneuroner (Takaki et al., 2006).

2.2.1.2 HSF2

HSF2 har en väletablerad roll inom utvecklingsbiologi och differentiering, men aktiveras också vid cellstress och reglerar tillsammans med HSF1 uttrycket av Hsp-gener (Mathew et al., 1998; Östling et al., 2007). Inaktivt HSF2 existerar som dimerer som sedan bildar heterotrimerer med HSF1 vid akut värmestress och binder HSE i cellkärnan (Åkerfelt et al., 2010). HSF2 kan binda DNA också utan HSF1, och de två har endast delvis samma målgener (Vihervaara et al., 2013), men för maximal HSF2-bindning till Hsp70-promotorn vid värmestress eller proteosominhibering krävs HSF1. Vid stress reglerar HSF2 uttrycket av till exempel Hsp70, Hsp25, Hsp40 och Hsp110 (Östling et al., 2007). Heterotrimererna av HSF2 och HSF1 binder också nukleära stresskroppar (eng. nuclear stress bodies, nSB) vid lokus 9q12 i kärnan vid värmestress. Där aktiverar de uttrycket av ickekodande satellit III-transkript (sat-III) (Sandqvist et al., 2009) som attraherar splitsning-faktorer, vilka möjligtvis förändrar sat-III transkriptens utseende och funktion (Metz et al., 2004).

Stabiliteten hos HSF2 vid stresstimuli är märkbart kortare än hos HSF1. Aktiviteten hos HSF2 regleras till viss del av dess egna proteinnivåer, men också PTMs deltar i regleringen av HSF2. Ett ökat uttryck av HSF2 räcker för aktivering och translokalisering av HSF2 till kärnan (Björk & Sistonen, 2010). Samtidigt som aktiviteten hos HSF2 ökar vid höjda proteinnivåer och stress minskar dess proteinnivåer vid fortgående värmestress, och heteromere med HSF1 kan inte längre bildas (Åkerfelt et al., 2010). HSF2 nedregleras via ubiquitinering av E3-ligaset APC/C och nedbrytning i proteasomen (Björk & Sistonen, 2010). Till skillnad från DBDn hos HSF1 är DBDn hos HSF2 sumoylerad vid lysin 82 (Jaeger et al., 2016) vilket möjliggör andra målgener för HSF2 än för HSF1. Sumoyleringen har också visats vara en regleringsmekanism för HSF2. Så länge SUMO (eng. small ubiquitin-like modifier) är bundet till DBDn påverkars bindningen mellan DNA och HSF2 negativt (Björk & Sistonen, 2010). HSF2 regleras också av mikro-RNA 18 (miR-18), som nedtystar uttrycket av HSF2 genom att binda dess 3'-UTR. I manliga könsceller hos möss förändras uttrycket av HSF2-målgener in vivo då miR-18-uttrycket nedreglerades (Björk et al., 2010).

HSF2 deltar i andra processer i cellen än värmechockresponsen: HSF2 behövs till exempel för korrekt migration av neuroner vid hjärnans utveckling och normal spermatogenes (Wang et al., 2003; Åkerfelt et al., 2008). Vid mitosen påverkar uttrycket av HSF2 cellens stresstålighet negativt. När proteinnivåerna av HSF2 nedregleras tillåter det bindning mellan DNA, HSF1 och RNA pol II, vilket leder till uttryck av Hsp70 och stresskydd under mitosen. HSF2 har visats vara en tumörsuppressör via reglering av signalräckor för epitelcellers plasticitet i prostatacancer. Det finns även patientunderlag som indikerar liknande funktioner hos HSF2 i andra cancerformer, till exempel bröstcancer, lungcancer, äggstockscancer, hjärncancer (glioblastom) och njurcancer (Björk et al. 2016).

2.2.2 Värmechockproteinerna skyddar cellen

Hsp är molekylära chaperoner som produceras i respons till stress som en del av värmechockresponsen, men de har även stressoberoende funktioner. Hsp skyddar proteiner från skador och felaktiga interaktioner med andra proteiner, assisterar vid proteinveckning och proteintransport samt fungerar som reglerare av cellulära processer.

Chaperoner är en del av cellens proteostasnätverk och Hsp70 och Hsp90 hör till de mest studerade chaperonfamiljerna. De är basalt uttryckta och utgör så mycket som 1-2 % av cellens totala proteininnehåll (Labbadia & Morimoto, 2015). Korrekt proteinveckning är nödvändig för att proteiner ska bli funktionella och chaperoner är aktiva vid cellens normalstillstånd, till exempel kontrollerar de veckningen av makromolekylkomplex som till exempel steroidhormonreceptorerna (Pratt & Toft, 2003). Även glukokortikoidreceptorn är beroende av Hsp för sin funktion. Hsp70 förhindrar felaktiga interaktioner, felveckning och aggregering, och Hsp90 skyddar bindningsstället för liganden från att ändra konformation (Gidalevitz et al., 2011).

ATP behövs för att åstadkomma konformationsförändringen som krävs för att Hsp70 och Hsp90 ska kunna binda substrat, och innan ett protein är färdigt veckat behövs flera rundor där chaperonen släpper och binder substratet på nytt. Hsp70 och Hsp90 interagerar med cochaperoner för olika funktioner: till exempel reagerar cochaperonerna CHIP och BAG1 vid långsam omveckning för att främja ubiquitinerings av substratet med degradering i proteasomen som följd (Connell et al., 2001). Hsp90 har över 20 cochaperoner medan Hsp70 främst interagerar med cochaperoner från HSP40/DNAJ-familjen. Cochaperonerna definierar funktionerna hos chaperonerna. HSP40/DNAJ presenterar felveckade proteiner till Hsp70 och stimulerar ATPas-aktivitet, medan Hsp70 rekryteras till nysyntetiserade proteiner av det ribosomkopplade komplexet RAC som innehåller ett HSP40/DNAJ-protein. Hsp70 och Hsp90 samarbetar också med varandra via cochaperonen HOP (eng. HSC70/HSP90 organizing protein) vid veckning av steroidhormoner och signaltransduktionskinas (Labbadia & Morimoto, 2015).

Eftersom chaperoner är nödvändiga för funktionen hos proteiner kan de inverka på regleringen av signalräckor. Vid stress stoppar till exempel Hsp70 celltillväxt-signalräckan Ras/Raf-1 genom att förhindra interaktion mellan cochaperonen Bag1 och Raf-1 (Song et al., 2001). Ihopsättningen av proteinkomplexet mTORC1 är beroende av tillräckliga chaperonresurser, vilket gör mTORC1 känsligt för stresstillstånd. mTORC1 reglerar proteinsyntesen och reagerar på signaler från insulin, tillväxtfaktorer, rapamycin, aminosyror, mekaniska stimuli, oxidativ stress och fosfatidinsyra. mTORC1-komplexet kan därför fungera som sensor för näring, energi och redoxbalans och reglerar proteinsyntesen enligt cellens tillstånd (Qian et al., 2010).

2.3 HSF1 kopplas till cancer, livslängd och neurodegenerativa sjukdomar

Funktionerna hos HSF1 är nödvändiga för cellens hälsa, men har trots det både sjukdomsfrämjande och sjukdomsförhindrande egenskaper vid olika sjukdomstillstånd. HSF1 främjar cancerutveckling i olika djurmodeller (Dai et al., 2007, Min et al., 2007) och HSF1 kopplas till dåliga prognoser hos cancerpatienter (Santagata et al., 2011) samt driver uttrycket av cancerrelaterade gener i tumörceller och stroma (Mendillo et al., 2012). I cancerceller är HSF1 nyckeln till ett transkriptionsprogram som orsakar malignitet, och avsaknad av HSF1 har tumörsuppresserande effekter som till exempel apoptos av cancerceller (Mendillo et al., 2012). HSF1 anses däremot beskyddande vid neurodegenerativa sjukdomar med proteinaggregat, som till exempel Alzheimers, amyotrof lateralskleros (ALS) och Huntingtons, och en aktivering av HSF1 har föreslagits som ett terapeutiskt alternativ vid dessa sjukdomstillstånd (Neef, 2011; Labbadia & Morimoto, 2015). Antioxidanten SOD1, som är en målgen för HSF1 vid stress (Vihervaara et al., 2013), är muterad i ca 1 % av alla ALS-fall (Carri et al., 2015) och var den första nedärvda genen att kopplas ihop med sjukdomen (Rothstein et al., 1994). I odlade motorneuroner syntes ingen ökning i Hsp70-nivån vid värmestress, exponering för excitotoxiskt glutamat eller vid uttryck av muterat SOD1 (glycin till alanin vid plats 93, G93A). Den uteblivna ökningen av Hsp70 hämmade värmechockresponsen. Däremot syntes en tydlig inducering av Hsp70 vid uttryck av konstant aktiv HSF1, samt vid proteasominhibering som ledde till ackumulering av HSF2. I paraffinsnitt av ryggradsceller från både sporadiska och familjära ALS-patienter fanns inget uttryck av Hsp70 (Batulan et al., 2003). Inte heller i ryggraden hos transgena möss (G93A) kunde Hsp70-uttryck konstateras. Detta indikerar en hög aktiveringsgräns för värmechockresponsen i motorneuroner eftersom HSF1 inte aktiveras trots olika typer av cellstress. Det är oklart varför aktiveringen av värmechockresponsen inte sker i motorneuroner, men detta öppnar för en koppling mellan HSF1 och ALS (Batulan et al., 2003).

HSF1-homologen HSF-1 i nematoden *Caenorhabditis elegans* påverkar organismens livslängd positivt genom att nedreglera insulinsignaleringsräckan. Avsaknad av HSF-1 förkortade livslängden medan överuttryck av HSF-1 förlängde livslängden hos

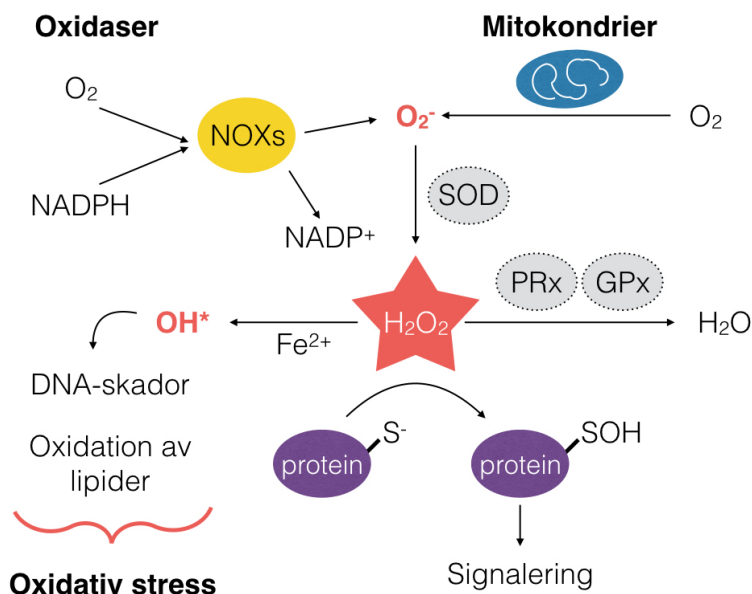
Caenorhabditis elegans (Hsu et al., 2003). I jäst förlänger SIR2 organismens livslängd (Kaeberlein et al., 1999), och hos människan regleras DNA-bindningen hos HSF1 av SIR2-homologen SIRT1 (Westerheide et al., 2009). SIRT1 har andra målgener som till exempel FOXO-familjen, NFκ-B och p53, och påverkar ett flertal cellulära processer som metabolism, cancer, oxidativ stress, inflammation och åldrande (Rahman & Islam, 2011). SIRT1 aktiveras vid stress, men vid åldrande minskar mängden SIRT1 och som följd minskar DNA-bindningen hos HSF1 (Heydari et al., 1996). Minskad HSF1-aktivitet leder till proteotoxisk stress som orsakar åldrande, och åldrande leder i sig till olika sjukdomar och har negativ inverkan på uttrycket av chaperoner, proteasomaktiviteten och stressresponsen (Labbadia & Morimoto, 2015). Intressant nog återställde ett restriktivt kaloriintag hos cellerna bindningsaktiviteten mellan HSF1 och DNA (Heydari et al., 1996).

2.4 Oxidativ stress

Oxidativ stress i cellen skapas av ROS, som orsakar skada på lipider, proteiner och DNA, till exempel avbrutna DNA-strängar, punktmutationer och DNA cross-linking. ROS omfattar anjonen superoxid (O_2^-), väteperoxid (H_2O_2) samt hydroxylradikaler (OH^\bullet) (Cross et al., 1987). ROS bildas av oxidaser som NOX, och i mitokondrierna som biprodukt vid reducering av molekylärt syre vid aerob respiration och ATP-syntes. Mitokondrierna producerar superoxid i elektron-transportkedjans komplex I och III, vilket utgör cellens största ROS-källa. Av allt syre som används i celledningen blir 1-5 % superoxid (Reuter et al., 2010).

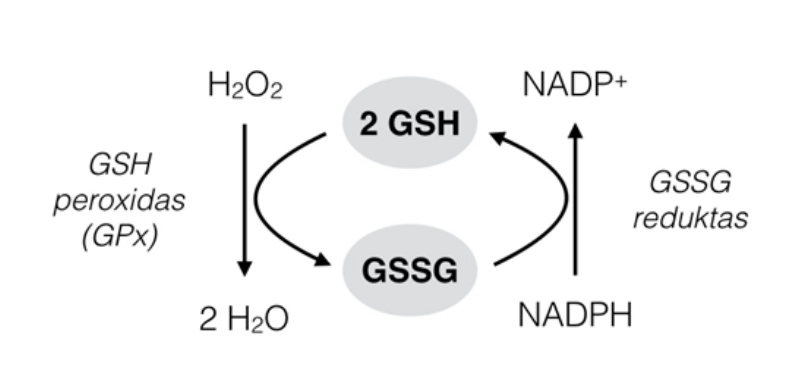
Skador på mitokondrierna orsakar oxidativ stress i cellen då ROS-molekyler släpps ut från mitokondriernas membran. Vid avsaknad av syre producerar mitokondrierna kväveoxid (NO) som kan skapa reaktiva kvävemolekyler (eng. reactive nitrogen species, RNS) samt olika biprodukter av lipidperoxidering. H_2O_2 skapas från superoxid (figur 4) eller från syre i cellens peroxisomer. H_2O_2 kan diffundera genom mitokondier och cellmembran och kommer därför åt att skada cellens olika strukturer (Reuter et al., 2010). Skadligast för cellen är ändå OH^\bullet som skapas in vivo i reaktioner mellan H_2O_2 och reducerade övergångsmetaller, till exempel joner av Fe, Co, Ni och Cu, dock mest via Fenton-reaktionen mellan Fe^{2+} och H_2O_2 . OH^\bullet är instabil och reagerar genast med

de molekyler den kommer i kontakt med. När OH^\bullet reagerar med DNA bildas 8-hydroxiguanosin (8-OHG) som sedan hydrolyseras till 8-hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG), som används som markör för radikalattacker på DNA (Reuter et al., 2010).



Figur 4. Schematisk bild över cellens ROS-metabolism. Superoxid (O_2^-) skapas i mitokondrierna och av kväveoxidaser vilket kräver enzymatisk aktivitet av SOD för att undvika oxidativa skador i cellen. SOD konverterar O_2^- till H_2O_2 som konverteras till vatten av glutathionperoxidas (GPx). H_2O_2 kan också bilda hydroxylradikaler (OH^\bullet) via kontakt med järnjoner. OH^\bullet är instabilt och reagerar genast med de molekyler eller strukturer den kommer i kontakt med. H_2O_2 deltar även i cellsigneringen.

Cellen skyddar sig mot ROS med till exempel superoxiddismutas (SOD), glutathionperoxidas (GPx) och glutathionreduktas (GSR), samt olika antioxidanter utan enzymatiska egenskaper som glutation (GSH), vitamin C och vitamin D (Reuter et al., 2010). SOD1 och SOD2 konverterar superoxid till väteperoxid (Halliwell, 1994) och förhindrar ansamling av superoxid i cellen (figur 4). SOD2 är lokaliserat i mitokondriernas matrix medan SOD1 finns i cytoplasman (Schieber & Chandel, 2014). GPx använder GSH för att konvertera H_2O_2 till vatten, vilket utgör ett viktigt skydd mot oxidativ stress (figur 4, figur 5). GSH har även visats oskadliggöra karcinogena ämnen i cellen utöver att skydda DNA från de skador som ROS kan orsaka.



Figur 5. Glutationcykeln hanterar ROS i cellen. Glutation oxideras till glutationdisulfid av H₂O₂ och GPx, för att sedan återfå sina antioxidativa egenskaper som glutation av NADPH och GSSG-reduktas.

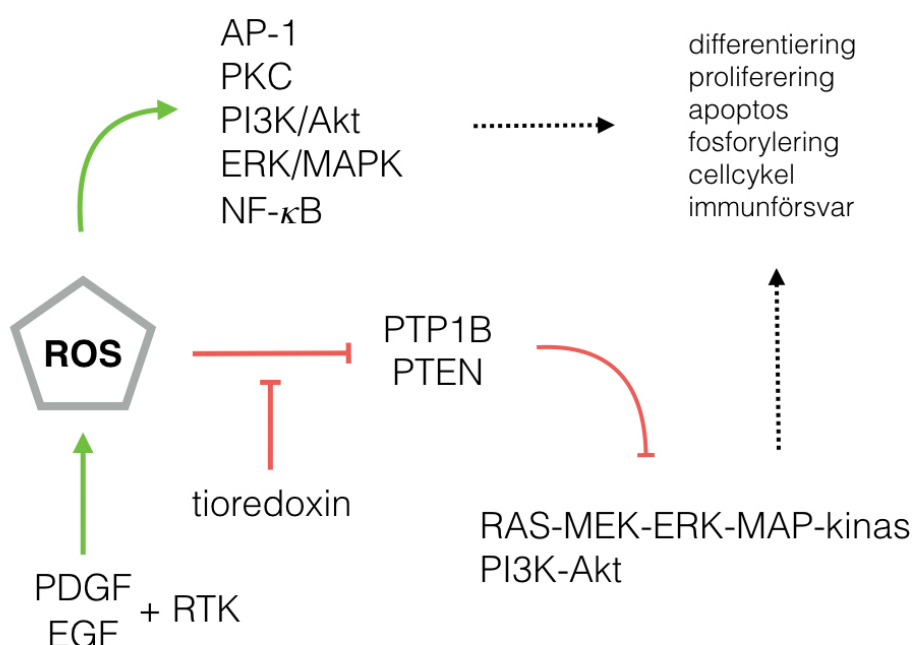
Balansen mellan GSH och glutationdisulfid (GSSG) indikerar cellens oxidativa tillstånd. När GSSG-nivån stiger är cellen i ett tillstånd av oxidativ stress (Halprin & Ohkawara, 1967). Tiolgruppen (-SH) på GSH ger molekylens dess antioxidativa egenskap. Tiolgruppen donerar en elektron som tillsammans med en annan elektron reducerar H₂O₂ till vatten, varefter två reaktiva glutationmolekyler reagerar med varandra och bildar GSSG. GSSG kan sedan konverteras tillbaka till GSH av glutationreduktas och NADPH (figur 5). När cellens ROS-produktion överstiger antioxidanternas buffertförmåga ansamlas OH• och H₂O₂ i cellen, vilket leder till permanenta skador på cellens strukturer, funktioner och DNA (Schieber & Chandel, 2014). Om cellen utsätts för oxidativ stress under en lång period ökar sannolikheten för somatiska mutationer och neoplastisk transformation. Oxidativ stress är också en mekanism för anpassning till omgivningen, då superoxid aktiverar signalräckor som antingen anpassar cellen till ett tillstånd av ökad oxidativ stress eller leder till apoptos (Chen et al., 2009).

2.4.1 Redoxsignaler

ROS utgör ett led i en reversibel signaltransduktionsmekanism, där ROS-molekyler används i en rad signaleringsräckor (figur 6) med varierande funktioner vid till exempel celltillväxt, inflammationssignaler, cellcykel eller apoptos (Reuter et al., 2010; Schieber & Chandel, 2014). H₂O₂ oxiderar tioler på cystein i proteiner, vilket ändrar proteinernas konformation och funktion då reaktiva tioler reagerar med varandra och bildar cysteinbindningar. Den här konformationsförändringen kan upphävas av

thioredoxin eller glutaredoxin. ROS i låga koncentrationer kan till exempel aktivera signalräckorna för nukleärfaktor κ B (NF- κ B), aktiveringsprotein 1 (AP-1), extracellulärt reglerat kinas/mitogenaktiverat proteinkinas (ERK/MAPK), proteinkinas C (PKC) och fosfoinositid-3-kinas/proteinkinas B (PI3K/Akt). H_2O_2 aktiverar NF- κ B genom att bryta ner dess inhibitor I κ Ba, och ROS startar både syntetiseringen och aktiveringen av AP-1, som reglerar celltillväxt och apoptos (Reuter et al., 2010).

Tillväxtfaktorerna EGF och PDGF ökar cellens ROS-produktion via NADPH-oxidaser och det har visats att ROS är nödvändigt för den autofosforylering av receptortyrosinkinaser (RTK) som sker när dessa binder tillväxtfaktorer (Sundaresan et al. 1995). H_2O_2 som producerats till följd av att EGF bundit RTK inaktiverar proteintyrosinfosfatasen PTEN och PTP1B genom att oxidera deras katalytiska cysteiner (Bae et al., 1997). PTEN och PTP1B är negativa reglerare av tillväxtsignalräckorna PI3K-Akt och RAS-MEK-ERK MAP-kinas, och inhiberingen av PTEN och PTP1B med ROS leder till nedströms signalering i dessa tillväxtsignalräckor. Iniberingen av proteintyrosinfosfatasen upphävs av tioredoxin (Lee et al., 1998, 2002).



Figur 6. Cellen använder ROS som modifierare av signalräckor. Genom att ändra proteiners konformation med oxidering av tioler (-SH) på cystein orsakar ROS både aktivering och inhibering av signalräckor som reglerar cellens centrala funktioner.

Redoxsignalering som kräver ökade ROS-nivåer och H_2O_2 påverkar ändå inte nivåerna av GSSG/GSH och NADPH/NADP⁺ (oxiderat NADPH) i cellen, utan det är först vid oxidativ stress som dessa nivåer påverkas (Murphy 2012). H_2O_2 är ett normalt inslag i cellens signaleringsmaskineri, och inducerad oxidativ stress kan därför ha ospecifika följder på grund av tioloxideringen och dess betydelse för proteiners konformation och nedströms signalering.

2.4.2 Oxidativ stress aktiverar värmechockresponsen

Oxidativ stress aktiverar HSF1 och uttrycket av Hsp (Lee et al., 2000; Ahn & Thiele, 2003). HSF1-bindningen till DNA är beroende av tillräcklig mängd tioredoxin i cellen, då DNA-bindningsdomänen hos HSF1 innehåller flera cystein som lätt oxideras av ROS. Oxideringen av cystein inaktiverar HSF1, men ROS orsakar också en samtidig ökning av tioredoxin i cellen, vilket reducerar de oxiderade cysteiner på HSF1 och på nytt möjliggör bindning till DNA (Jaquer-Sarlin & Polla, 1996). I motsats till detta har det visats att oxidering av cysteiner på HSF1 tvärtom leder till aktivering av HSF1 (Ahn & Thiele, 2003), vilket understöds av att reducering av proteiner med DTT hindrar aktiveringen av HSF1 och uttrycket av Hsp-gener (Trott et al., 2008).

Det har visats att HSF1 sänker ROS-nivåerna i cellen och skyddar mot apoptos (Bierkamp et al., 2010; Zhang et al., 2011; Choi et al., 2013), och i mushjärtat samt i oocyter och embryon från möss behövs HSF1 för att bibehålla redoxbalansen och hindra uppkomsten av skador orsakade av oxidativ stress (Yan et al., 2002, Bierkamp et al., 2010). Vid oxidativ stress är förflyttningen av HSF1 till kärnan beroende av ERK fosforylering av apoptossuppressorn BIS. I muterade gliomceller där fosforyleringen av BIS förhindrats var BIS bundet till HSF1 även vid oxidativ stress, och förflyttningen av HSF1 till kärnan och ökningen i Hsp70-nivån var signifikant lägre. I stället leddes cellerna till H_2O_2 -inducerad celldöd (Kim et al., 2016), vilket bekräftar att HSF1 är nödvändig för cellens överlevnad vid oxidativ stress.

2.5 Oxidativ stress och sjukdomsutveckling

Oxidativ stress har knutits till åldrande och olika sjukdomar, till exempel ALS, Parkinsons, Alzheimers och cancer (Halliwell & Gutteridge, 1984; Rothstein et al., 1994; Lin & Beal, 2006; Reuter et al., 2010). ROS orsakar skador på DNA som kan mutera proto-onkogener och tumörsuppressorer och på detta sätt driva cellen till neoplastisk celltransformation. ROS påverkar genuttryck, cell-cell-kommunikation och signalsubstanser på ett sätt som leder till minskad apoptos och ökad cellproliferation (figur 6). ROS kan aktivera signalräckor som leder till celltillväxt och celldelning, men också angiogenes och metastasering (Reuter et al., 2010). Cancerceller utnyttjar den positiva inverkan som ROS har på tillväxt för att producera mer ROS, samtidigt som de höjer sin antioxidantaktivitet för att behålla redoxbalansen. ROS-aktiviteten i cancerceller tillåts öka utan att orsaka för mycket skada eftersom H_2O_2 bildas precis i närheten av de signalräckor där det kan påverka (Schieber & Chandel, 2014). Det har visats i flera celltyper hos däggdjur att H_2O_2 och OH^\bullet orsakar mitogenes och cellproliferation (D'Souza et al., 1993), samt att antioxidanterna SOD, katalas, B-karoten och flavonoider stoppar cellproliferation in vitro (Alliangana 1996). På grund av sin mångsidiga aktivitet i cellens olika signalräckor och sin mitogena egenskap har ROS en komplex roll i cancerutveckling.

Problem med att hantera oxidativ stress anses vara en möjlig orsak för utveckling av ALS. Antioxidantenzymet SOD1 är muterat i ca 1 % av alla ALS-fall, främst bland nedärvd ALS (Rothstein et al., 1994; Carri et al., 2015), och mutationen leder till minskad aktivitet hos SOD1. När SOD1 inhiberades i organliknande ryggmärgsodlingar ledde det till apoptos bland motorneuronerna och andra ryggmärgsneuroner, och degraderingen ökade vidare med inhiberad glutamattransport (Rothstein et al., 1994). Biomarkörer för oxidativ stress hittas också vid fall av sporadisk ALS (D'Amico et al., 2013). I en ALS-musmodell med muterad SOD1 orsakade sänkta GSH-nivåer en ökning i skador på mitokondrier och neuroner (Vargas et al., 2011). GSH-nivåer har visats vara lägre i motoriska delen av hjärnans cortex hos ALS-patienter än hos friska människor (Weiduschat et al., 2014), och odlade neuroner som saknar GSH uppvisar de för ALS typiska TDP-43-ansamlingarna vid cellkärnan (Iguchi et al., 2012).

Oxidativ stress och skador i mitokondrierna har visats ha en betydande inverkan på degenereringen av dopaminerga neuroner i Parkinsons sjukdom (Dias et al., 2013). Degenereringen innebär förlust av många olika neurontyper, men det är de förlorade dopaminerga neuronerna i hjärnans substantia nigra pars compacta (SN) som i huvudsak orsakar sjukdomens motoriska symptom. De dopaminerga neuronerna är därför mål för läkemedelsutveckling (Fahn et al., 2004). I post mortem-analyser av hjärnvävnad från patienter har biprodukter från peroxidering av lipider och oxidationsprodukter av DNA och RNA hittats, vilket indikerar exponering för oxidativ stress. Förhållandet GSH/GSSG i SN är lägre hos Parkinsonspatienter jämfört med kontroller (Jones & Go, 2010). Oxidativ stress som potentiell orsakare av Parkinsons understöds ytterligare av att djurmodeller för de motoriska symptomen kan skapas genom exponering för olika toxiner som orsakar oxidativ stress (Dias et al., 2013). Hjärnans stora syrekonsumtion gör neuronerna extra utsatta för oxidativ stress orsakad av ROS-produktion, och lipidperoxidering av fleromättade fettsyror i hjärnan skapar toxiska biprodukter vid oxidativ stress. De dopaminerga neuronernas signalsubstans dopamin är instabil och bildar dopaminkinoner och fria radikaler via auto-oxidering (Munoz et al., 2012). Vid åldrande och Parkinsons byts det dopaminmetaboliserande enzymet monoaminoxidas A (MAO-A) ut till monoaminoxidas B (MAO-B), vilket leder till produktion av H₂O₂ och OH• vid dopaminmetabolism (Kumar et al., 2014). Dessutom orsakar vissa Parkinsonskopplade gener ökat upptag av dopamin och samtidigt problem med dopaminförvaring, och flera kopplingar till oxidativ stress hittas bland Parkinsonskopplade proteiner, till exempel parkin, alfa-synuklein, DJ-1, PINK1, och LRRK2 (Dias et al., 2013).

Fria syreradikaler som orsak till åldrande föreslogs av Harman redan 1956, men hypotesen har visats svår att bevisa och den förenklar ROS inverkan på biologin bakom åldrande. Forskare har försökt förlänga livslängden hos till exempel *Caenorhabditis elegans* och *Drosophila melanogaster* genom att manipulera olika antioxidanter, men resultaten är varierande. I *Caenorhabditis elegans* har SOD1-mutanter normal livslängd medan SOD2-mutanter hade ökad livslängd, och hos *Drosophila melanogaster* har ett allmänt överuttryck av katalas, SOD1 och SOD2 via deras egna promotorer ingen inverkan på livslängden medan vävnadsspecifikt överuttryck av SOD2 med transgener ökade livslängden. SOD1-knock-out-möss har 30 % kortare livslängd än kontroller,

men i transgena möss har ett överuttryck av olika endogena antioxidanter som till exempel SOD1 ingen effekt på livslängden, och SOD1-knock-out-mössens korta livslängd antas bero på andra faktorer än accelererat åldrande (Dai et al. 2014). I stället är det oxidativa skador på mitokondrierna och deras DNA (eng. mitochondrial DNA mtDNA) som föreslås orsaka symptom på åldrande. ROS skapas i mitokondrierna och därför är mtDNA speciellt utsatt för punktmutationer och deletioner orsakade av ROS. Antioxidanter som är märkta specifikt för mitokondrierna kan därför ha en inverkan på livslängden. I muslinjen C57Bl6 ledde överuttryck av katalas (mCAT) till både förlängd medianlivslängd och maximallivslängd (Schriner et al., 2005). Även antioxidanten SkQ1 som lokaliseras till mitokondrierna har visats förlänga livslängden i både mus- och hamstermodeller (Anisimov et al., 2011). Möss med homozygot mutation i exonukleasdomänen av mitokondriellt gammapolymeras accumulerade punktmutationer och deletioner i sitt mtDNA vilket gav dem kortare livslängd och symptom på åldrande som till exempel osteoporos, gråhårighet, håravfall, minskad muskelmassa (sarcopenia) samt försämrad hörsel (presbycusis) (Trifunovic et al., 2004). Det finns en trend som kopplar oxidativ stress, mitokondrier och förekomsten av antioxidanter med åldrande, men mekanismerna för detta är inte ännu klarlagda.

3 Målsättning

Värmechockresponsen är en välkänd skyddsmekanism i cellen, men det finns utrymme för mer forskning vad gäller dess reglering och funktion vid oxidativ stress. I den här pro gradu-avhandlingen undersöktes effekten av oxidativ stress orsakad av H₂O₂ respektive menadion på de relativa protein- och mRNA-nivåerna av HSF1, HSF2 och Hsp70, samt bindningen av HSF1 och HSF2 till promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering. Linjen K562 av humana erytroleukemiceller valdes som modellsystem. När projektet inleddes 2014 indikerade opublicerade resultat från professor Lea Sistonens forskningsgrupp en minskning i proteinnivåerna av HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress, och avhandlingens syfte blev att försöka utreda orsaken till detta. Under projektets gång lyftes nya frågeställningar angående induceringen av Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering med MG-132. Bindningen av HSF1 och HSF2 till målgenen Hsp70 vid oxidativ stress samt genuttrycket av Hsp70 undersöktes, likaså den intracellulära lokaliseringen av HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress och värmestress. Projektets målsättning var att:

- Kontrollera de relativa protein- och mRNA-nivåerna för HSF1, HSF2 och Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering
- Undersöka bindingsgraden för HSF1 och HSF2 till promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering
- Undersöka den intracellulära lokaliseringen av HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress

Page Break

4 Material och metoder

4.1 Cellkultur och behandling

K562-celler är humana erytroleukemiceller som härstammar från en patient med kronisk myeloid leukemi (Lozzio & Lozzio, 1975). Cellerna odlades i RPMI 1640-medium (Sigma) med 10% fetalkalvserum, 2 mM L-glutamin och 50 µg/ml penicillin/streptomycin vid 37 °C och med en koldioxidhalt på 5 %.

Inför Western blotting-analys och qRT-PCR behandlades cellerna i 6-hålsplattor (1 miljon celler per brunn) med 50 µM menadion eller 1 mM H₂O₂ för att inducera oxidativ stress samt med 10 µM MG-132 så att proteasomaktiviteten inhiberades. I kontrollen behandlades cellerna med 2 µl DMSO (förvaringsbuffert för MG-132) och 2 µl 100 % etanol (menadionet löstes i etanol). Cellerna behandlades i 3 h vid 37 °C. Cellerna skördades på is och centrifugerades vid 4 °C vid 1000 x g i 2 minuter, tvättades med 4 °C PBS och centrifugerades på nytt. Cellpelleten resuspenderades i PBS och cellsuspensionen delades för qRT-PCR respektive Western blotting. Cellsuspensionen centrifugerades vid 4 °C vid 2000 x g i 2 minuter och supernatanten avlägsnades. Cellpelletarna frystes genast ner och förvarades vid - 80 °C.

Inför qRT-PCR behandlades cellerna i 6-hålsplattor (1 miljon celler per brunn) först med 10 µM MG-132 i 1 timme för att inhibera proteasomaktiviteten, och sedan efter att cellerna tvättats med PBS tillsattes 50 µM menadion eller 1 mM H₂O₂ i 5 timmar för att inducera oxidativ stress. Detta för att kunna undersöka ifall oxidativ stress inhiberar induktionen av Hsp70 som MG-132 åstadkommer. I kontrollen behandlades cellerna med 2 µl DMSO (förvaringsbuffert för MG-132) och 2 µl 100 % etanol (menadionet löstes i etanol). Cellerna behandlades vid 37 °C. Cellerna skördades på is och centrifugerades vid 4 °C vid 1000 x g i 2 minuter, tvättades med 4 °C PBS och centrifugerades på nytt vid 2000 x g och supernatanten avlägsnades. Cellpelletarna frystes genast ner och förvarades vid - 80 °C.

Inför CHIP förbereddes fyra cellodlingsplattor med 5 miljoner celler i 10 ml medium en dag före behandlingen. De olika cellproverna behandlades med proteasominhibitorn

MG-132 eller med menadion som orsakar oxidativ stress, samt med båda ämnena samtidigt, på följande sätt: platta 1, kontroll, 2 µl 100 % EtOH, 2 µl DMSO; platta 2, 50 µM menadion och 2 µl DMSO; platta 3, 2 µl 100% EtOH, 10 µM MG-132; platta 4, 50 µM menadion, 10 µM MG-132. EtOH användes som kontroll för menadion-behandlingen eftersom menadionet lösts upp i 100 % EtOH. DMSO användes som kontroll för MG-132 som var löst i DMSO. Efter att respektive ämnen tillsatts inkuberades cellerna 30 minuter vid 37 °C.

Inför cellfraktioneringen förbereddes tre cellodlingsplattor med 10 miljoner celler i 10 ml medium en dag före behandlingen. Cellerna behandlades på följande sätt: en kontroll med 10 µl etanol (motsvarande mängden etanol som tillsätts i menadionbehandlingen), 3 timmar menadionbehandling med 50 µM menadion, respektive 30 minuter värmechock vid 42 °C.

4.2 Lysering med buffert C och Bradford-proteinanalys

Cellpelletarna suspenderades i 50 µl buffert C innehållande 0,5 mM DTT, som reducerar SH-grupper i proteinerna och hindrar dem från att bilda disulfidbindningar och 0,5 mM PMSF som inhiberar serinproteaser, acetylkolinesteras och thiolproteaser. Cellsuspensionen läts stå på is i 20 minuter medan den blandades några gånger. Proven centrifugerades sedan i 8 minuter vid 13 000 x g och 4 °C för att separera de olösliga proteinerna, och supernatanten med cellens lösliga proteiner sparades.

Provens proteinkoncentrationer mättes med Bradford-analys, som är en kolorimetrisk analys där färgen Coomassie brilliant blue reagerar med arginin och aromatiska delar i proteinerna. Vid bindning mellan färgen och proteinerna ändrar färgens maximala absorbans från 470 nm till 595 nm. I en 96-hålsplatta tillsattes 1 µl av varje prov och 200 µl Bradford-reagens, och absorbansen vid 595 nm mättes med Hidex Sense mikrohålsplattläsare varefter proteinhalten räknades ut med hjälp av en standardkurva. För standardkurvan över absorbansen användes olika koncentrationer av bovint serumalbumin (BSA, eng. bovine serum albumin). 10 µg protein från varje prov kördes i polyakrylamidgelelektrofores med natriumdodekylsulfat (SDS-PAGE, eng. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

4.3 Western blotting

Western blotting används för att kunna detektera specifika proteiners relativa mängd i cellprov. Denna analytiska metod bestämmer relativa förändringar i proteinmängd jämfört med en kontroll. Western blotting omfattar SDS-PAGE, transfer och immunoblotting. I SDS-PAGE separeras proteinerna i cellysats från varandra på en gel enligt molekylvikt med hjälp av elektrisk ström. Vid transfer överförs de separerade proteinerna från gelen till ett membran. På membranet görs immunoblotting där en primär antikropp binder protein och den sekundära antikroppen är konjugerad med pepparrotsperoxidas som skapar luminiscens i proportion till mängden protein när luminol oxideras. Luminiscensen detekteras med ljuskänslig film.

4.3.1 SDS-PAGE

Genom användning av SDS-PAGE separeras proteinerna från cellysats i en gel utgående från sin molekylvikt. Separeringen möjliggörs av SDS, som denaturerar proteinernas tertiär- och sekundärstruktur, täcker alla proteiners laddningar med en negativ laddning och gör molekylernas laddning proportionell till molekylvikten. Det möjliggör att alla proteiner migrerar i mot den positiva polen i gelen, och att proteinernas 3D-struktur inte påverkar migreringen. SDS finns både i gelen och i lyseringsbufferten Laemmli. Gelen i en SDS-PAGE är delad i en övre gel, som packar ihop proteinerna, och en nedre gel som separerar proteinerna enligt storlek. Båda gelerna består av gellösning (övre eller nedre), SDS, akrylamid, destillerat vatten samt de polymeriserande TEMED och APS. Både 8 % geler och Bio-Rad Mini-PROTEAN TGX Precast gels användes. Till frysta cellprov tillsattes 40 µl Laemmli-buffert, som innehåller β-merkaptoetanol som bryter proteinernas disulfidbryggor, och proven kokas 10 min och pipetteras i brunnar i övre delen av gelen tillsammans med en molekylviktsmarkör. Som markör användes Blue Protein Broad Range marker (Thermo Scientific).

Proteinerna och markören migrerar sedan ner längs gelen på grund av sin negativa laddning med hjälp av elektrisk ström. Gelen körs i en Tris-Gly-buffert med pH 8,3 och den övre gelen har ett pH på 6,8 och den nedre gelen ett pH på 8,8. Glycinets laddning förändras beroende på pH. På grund av strömmen tvingas de negativt laddade

glycinmolekylerna i bufferten in i den övre gelen, där pH är lägre, vilket förändrar laddningen hos glycin till neutral. De negativt laddade Cl-jonerna, från Tris-HCl i den övre gellösningen, migrerar snabbt genom gelen mot katoden och drar med sig de långsamma glycinmolekylerna. Detta tvingar ihop proteinerna i brunnarna mellan Cl-fronten och glycinfronten och låter proteinerna starta migrationen i den nedre gelen från samma linje. När gelen övergår i den undre delen av gelen med högre pH och högre akrylamidkoncentration, kommer glycinmolekylerna att bli negativt laddade och migrera snabbare än proteinerna mot katoden. Den högre akrylamidkoncentrationen gör det svårare för proteinerna att migrera, och de separeras därför tydligt enligt storlek, då de mindre proteinerna migrerar snabbare i gelen. Vid körningen användes 80 V i den övre gelen och 120 V i den nedre gelen, samt 200 V för Precast gels.

4.3.2 Transfer

De separerade proteinerna överfördes från gelen till ett nitrocellulosamembran (PROTRAN nitrocellulose membrane) via Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Vid transfern placeras gelen och membranet mellan två Bio-Rad Turbo Transfer-pappershögar vätta i Turbo Transfer-buffert. Vid överföringen vandrar proteinerna från gelen till membranet med hjälp av elektrisk ström. Transfern kördes på 7 minuter vid 90 V. Våttransfer användes också som transfermetod. Gelen och membranet placerades i en smörgås mellan tre lager Wattman-papper vätta i buffert. Transfern kördes på 90 V i 45 minuter.

4.3.3 Immunoblotting

Membranet kokades i 10 min för att frigöra antikroppsbindningsstället för HSF2 och inkuberades 1 h i blocklösning (5 % fettfritt mjölkpulver i PBS-0,03 % Tween 20) för att undvika ospecifik proteinbindning av antikroppar. För att detektera proteinerna av intresse används specifika antikroppar. Först används en primär antikropp som binder proteinet, och sedan tillsätts en sekundär antikropp som konjugerats med pepparrotsperoxidas och som binder den primära antikroppen. Pepparrotsperoxidas oxiderar luminol, i form av ECL-lösning (eng. enhanced chemiluminescence), oxideras. Luminiscensen detekteras med ljuskänslig film och filmen framkallas.

Membranet tvättades med PBS-0,03 % Tween 20 för att få bort blocklösningen och inkuberades vid 4 °C med en primär antikropp över natten (se bilaga 2 för antikroppar). Membranet tvättades sedan med PBS 0,03 % Tween 20 3 x 10 min och inkuberades med en sekundär antikropp i blocklösning i 1 h. Membranet tvättades på nytt 3 x 10 min och inkuberades 1 minut i ECL Detection reagent (GE Healthcare UK), innan filmerna exponeras för membranen.

4.4 qRT-PCR

För att undersöka relativa mängder av mRNA i cellen används kvantitativ realtids-PCR (qRT-PCR, eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction). Först isoleras RNA från skördade celler, sedan syntetiseras cDNA från det erhållna RNA:t med omvänt transkriptas och till sist körs qPCR för de sekvenser man vill undersöka på det erhållna cDNA:t.

4.4.1 RNA-isolering

Direkt till skördade och frysta cellpelletar tillsattes 350 µl RLT-buffert (Qiagen, med 10 µl beta-mercaptoethanol per 1 ml), varefter 350 µl 70 % etanol pipetterades i och 700 µl lösning flyttades till centrifugeringskolumner med silicagel-filter (Qiagen) och centrifugerades 15 sekunder vid 8000 g. 700 µl RW1-buffert (Qiagen) tillsattes i kolumnerna och de centrifugerades 15 sekunder vid 8000 g. Därefter centrifugerades kolumnerna två gånger i 15 sekunder vid 8000 g med 500 µl RPE-buffert (Qiagen). Kolumnerna centrifugerades tomma 1 minut vid 8000 g för att få ut det sista av vätskan. RNA löstes från filtret med 40 µl milliQ-vatten som inkuberades 1 minut i rumstemperatur och sedan centrifugerades ner i eppendorfrör vid 8000 g i en minut. Provens RNA-koncentrationer mättes med NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

4.4.2 cDNA-syntes

För cDNA-syntes användes iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) 1 µg RNA blandades med 4 µl reaktionsbuffert, 1 µl omvänt transkriptas samt milliQ-vatten tills den totala volymen blev 20 µl. Proven läts stå 5 minuter i rumstemperatur varefter de placerades i värmebad vid 42 °C i 30 minuter för att aktivera reaktionen och sedan vid 85 °C

värmeblock i 5 minuter för att inaktivera reaktionen. cDNA-proven förvarades vid -20 °C.

4.4.3 qPCR

För att bestämma de relativa mängderna av HSF1-, HSF2- och Hsp70-mRNA användes qPCR med Taqman probe-baserad analys. Med qPCR amplifieras DNA samtidigt som mängden amplifierat DNA hela tiden mäts, så att provens relativa kvantitet av DNA sedan kan jämföras. Mätningen sker med hjälp av Taqman-prober med en fluorescent reporter och en quencher, som utnyttjar fluorescent resonans energitransfer (eng. fluorescent resonance energy transfer, FRET). Medan quenchern är i närheten av reportern absorberar den reporterns fluorescens signal, men när proben bundit DNA och Taq-polymeraset når den delas proben i delar, reportern och quenchern lösgörs från varandra och reporterns fluorescens signal kan registreras. Varje signal motsvarar en amplifiering av DNA, och dessa data kan sedan analyseras.

Reaktionsblandningen innehöll KAPA-mix (DNA-polymeras, reaktionsbuffert, dNTPs, MgCl₂), genspecifik framåtvänd primer (400 nM), bakåtvänd primer (400 nM), probe (100 nM), milliQ-vatten till en slutvolym på 8 µl samt 2 µl cDNA (utspädd 1:10). Resultaten analyserades i Microsoft Excel och normaliserades enligt GAPDH-mRNA. Se bilaga 3 för primers och prober.

4.5 ChIP

Kromatinimmunoprecipitering (eng. chromatin immunoprecipitation, ChIP) är en metod för att undersöka interaktioner mellan DNA och specifika proteiner. Först tillsätts formaldehyd, som stabiliserar bindningarna mellan DNA och DNA-bundna proteiner. Cellerna lyseras och kromatinet fragmenteras genom sonikering. DNA-sekvenser bundna till proteiner hålls intakta, och sekvenser som bundit proteiner av intresse isoleras sedan med antikroppar som är specifika för de bundna proteinerna. Antikropparna är bundna till G-sefarpärlor, och DNA-protein-antikropp-G-sefarpärlor komplexet isoleras med centrifugering, så att allt DNA som inte bundit rätt proteiner och därmed inte heller bundit pärlorna avlägsnas tillsammans med supernatanten. Sedan

bryts bindningarna mellan DNA och proteinerna och DNA-fragmenten extraheras med fenolkloroform. De erhållna DNA-fragmenten amplifieras med qPCR för att kunna jämföra de relativa mängderna av DNA och via detta hur mycket proteinerna av intresse har bundit den specifika sekvensen.

4.5.1 In vivo-stabilisering av DNA-proteinkomplex med formaldehyd

De under behandlingen bildade DNA-proteinkomplexen stabiliserades med tillsats av 11 % formaldehyd till en mediumkoncentration på 1 % formaldehyd. Cellplattorna skakades på is 5 minuter och stabuleringen avslutades med tillsats av glycin till en slutkoncentration på 0,125 M samt 5 minuter skakning på is. Cellerna skördades med centrifugering vid 1000 rpm i 2 minuter vid 4 °C och cellpelletarna tvättades en gång med 4 C PBS. Cellerna lyserades med 2 ml Joosts lyseringsbuffert och inkuberades på is 5 minuter. Kromatinet i celllysaten fragmenterades med Bioruptor Diagenode sonikator inställd på cykler med 30 sekunder sonikering och 30 sekunder återhämtning i 7 minuter.

4.5.2 Immunoprecipitering av DNA-proteinkomplex med specifika antikroppar

Provens proteinkoncentration mättes med Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific) och 200-300 µg protein från varje sonikerat lysat blandades med ChIP-buffert till en slutvolym av 1 ml. Celllysaten inkuberades roterande med 25 µl protein G-sepharospärlor (GE Healthcare), tvättade med TE-buffert, i 1 h vid 4 °C, för att avlägsna allt som ospecifikt binder pärlorna, varefter pärlorna centrifugerades ner vid 2000 x g i 2 min och supernatanten immunoprecipiterades vid 4 °C över natten med HSF1 SPA-901-antikropp (Enzo Life Sciences), HSF2 48f respektive normal kanin-IgG. IgG användes som negativ kontroll för DNA-bindningen. Proven inkuberades sedan roterande med 20 µl protein G-sepharospärlor i 3 h vid 4 °C och immunoprecipitaten centrifugerades 1 min vid 2000 x g vid 4 °C. 100 µl av supernatanten från IgG-proven sparades som input-kontroll. Med hjälp av input-kontrollen kan resultaten från proven normaliseras till varje provs totala mängd DNA. DNA-fragmenten och antikropparna bundna till protein G-sefarospärlorna hölls på is och tvättades sammanlagt sex gånger

med ChIP-tvättbuffert 1, ChIP-tvättbuffert 2 och ChIP-tvättbuffert 3, två gånger per buffert. De tvättade proven centrifugerades 1 min vid 2000 x G vid 4 °C.

4.5.3 Nedbrytning av proteiner och RNA samt frisättning och extrahering av DNA-fragment

Till protein G-sepharosproven tillsattes först 100 µl TE-buffert och sedan 2.5 µl 20 % SDS till alla prov, inklusive input-kontrollen. För att bryta ner proteiner och RNA inkuberades proven med 1 µl 20 mg/µl proteinas K och 3 µl 10 mg/ml RNas A i 2 h vid 37 °C. Bindningarna till DNA bröts med inkubering vid 65 °C över natten.

För att kunna extrahera DNA-fragmenten från proven och avlägsna alla denaturerade proteiner användes fenolkloroform. Vid tillsats av fenolkloroform till ett vattenbaserat prov bildas en vattenfas och en fenolkloroformfas. När faserna blandas löser sig de denaturerade proteinerna i fenolkloroformfasen medan DNA-fragmenten stannar i vattenfasen. Faserna separeras sedan med centrifugering. DNA-fragmenten i proven extraherades två gånger med 100 µl fenolkloroform och centrifugering vid 15000 x g i 5 min, och till sist med 100 µl kloroform och centrifugering vid 15000 x g i 5 min.

Precipitationen av DNA-fragmenten görs med natriumacetat och etanol. DNA-molekylerna är lösta i de vattenbaserade proven och Na⁺-jonerna i natriumacetat behövs för att neutralisera nukleinsyrornas negativt laddade fosfatgrupp och på så sätt fälla ut dem ur lösningen. Neutraliseringen sker lättare i en etanolmiljö än i en vattenmiljö. DNA:t precipiterades med 10 µl 3 M natriumacetat (pH 5.2) och 250 µl absolut etanol under 3 h inkubering vid -70 °C. Precipitaten centrifugerades vid 15000 x g i 12 min vid 4 °C och pelletarna tvättades med 70 % etanol och centrifugering vid 15000 x g i 12 min. Pelletarna läts lufttorka och resuspenderades i 50 µl TE-buffert. Proven förvarades vid -20 °C.

4.5.4 Detektering av immunorenat kromatin med PCR

För att bestämma bindning av HSF1 och HSF2 till promotorn för Hsp70 användes qPCR (eng. quantitative polymerase chain reaction) med Taqman probe-baserad analys, som beskrivits ovan. Se bilaga 3 för primers och prober.

4.6 Cellfraktionering

Cellfraktionering innebär isolering av cellens organeller så att deras respektive proteom kan analyseras. Enligt protokollet nedan separeras cellens innehåll i en fraktion med cellkärnor, en mitokondriefraktion, en membranfraktion och en löslig fraktion. Fraktionerna separeras enligt densitet med centrifugering i sukros-mannitol-Hepes-buffertar.

4.6.1 Homogenisering av K562-celler

Cellerna skördades med centrifugering vid 1000 rpm i fyra minuter och cellpelleten tvättades en gång med 1 ml 4 °C PBS, varefter celllösningen centrifugerades på nytt och cellpelleten togs till vara. Cellpelleten vägdes och dess volym räknades ut enligt 1 g celler = 0,8 ml, och cellerna resuspenderades i 9 volymer 1 x hypoton buffert, samt läts stå på is 5-10 minuter. Den hypotona bufferten lyserar cellemembranet medan organellerna hålls intakta. Cellerna homogeniserades sedan med en nål i storlek 25 med tolv drag och 2 delar 2,5 x MSH-buffert tillsattes för varje 3 delar hypoton buffert. En del av celllysaten sparades för western blotting-analys.

4.6.2 Isolering av fraktionen med cellkärnor

Celllysaten centrifugerades i 800 x g vid 4 °C i 10 min för att isolera fraktionen med cellkärnor till en pellet. Supernatanten innehållande de andra fraktionerna sparades och pelleten med den nukleära fraktionen resuspenderades i 1 ml 1 x hypoton buffert och centrifugerades i 800 x g vid 4 °C i 10 minuter. Supernatanten avlägsnades och pelleten tvättades 2-3 gånger med 1 ml tvättbuffert för cellkärnor tills supernatanten blev klar. Pelleten resuspenderades i 40 µl förvaringsbuffert och förvarades vid -20 °C.

4.6.3 Isolering av mitokondriefraktionen

Supernatanten centrifugerades i 10 minuter vid 800 x g vid 4 °C och supernatanten flyttades till en ren tub medan pelleten som bildats slängdes bort. Supernatanten centrifugerades vid 10 000 x g vid 4 °C i 10 minuter för att bilda en pellet av mitokondrierna. Supernatanten sparades och mitokondriepelleten tvättades två gånger

med tvättbuffert för mitokondrier (10 min, 10 000 x g, 4 °C.). Pelleten resuspenderades i 40 µl förvaringsbuffert och förvarades vid -20 °C.

4.6.4 Isolering av membranfraktionen och den lösliga fraktionen

Supernatanten centrifugerades i 60 minuter vid 100 000 x g i 4 °C i en ultracentrifug för att separera membranfraktionen från den lösliga fraktionen. Membranfraktionen samlades i en geléaktig pellet och supernatanten blev den lösliga fraktionen. Fraktionerna separerades i olika rör och blandades med 40 µl förvaringsbuffert. Fraktionerna förvarades vid -20 °C.

4.6.5 Proteinanalys

Fraktionernas proteinhalt bestämdes med Bradford-analys, som beskrivits ovan. 10 µg protein från de olika fraktionerna pipetterades per brunn i gelen vid SDS-PAGE, och Western blotting genomfördes enligt samma protokoll som ovan.

5 Resultat

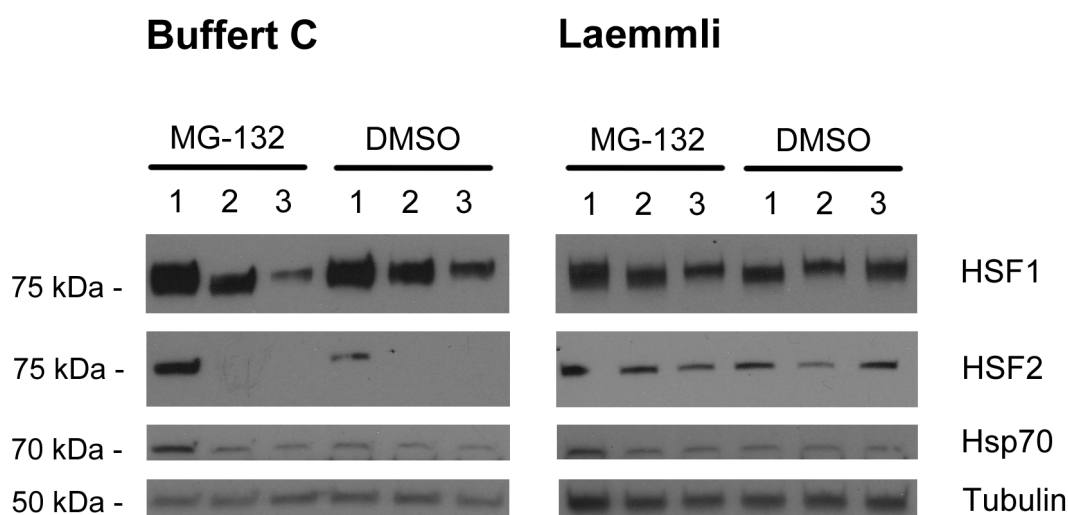
5.1 Lösligt HSF1 och HSF2 minskar vid oxidativ stress

Enligt opublicerade resultat från Sistonens laboratorium syntes en minskning i de relativa proteinnivåerna av HSF1 och HSF2 i K562-celler vid oxidativ stress (behandling med H_2O_2 eller menadion). Syftet för den här avhandlingen blev därför att undersöka orsaken till varför dessa transkriptionfaktorer minskar i relativ mängd vid ett stresstillstånd som tvärtom borde leda till en ökning i deras proteinnivåer (Lee et al., 2000; Ahn & Thiele, 2003). Proteinnivåer i cellen kan regleras till exempel via ubiquitinering av proteiner och nedbrytning av dessa i proteasomen (Mathew et al., 1998). Inverkan av proteasominhibering på de relativa proteinnivåerna av HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress undersöktes för att utreda ifall HSF1 och HSF2 nedregleras i proteasomen vid oxidativ stress. Proteasomens aktivitet inhiberades med MG-132 i K562-celler, varefter cellerna behandlades med H_2O_2 respektive menadion för att skapa oxidativ stress.

Western blot kördes först på celler lyserade med buffert C (figur 7) och en minskning i de relativa proteinnivåerna för HSF1 och HSF2 i kontrollen vid oxidativ stress kunde observeras (figur 7, buffert C, DMSO: 2, 3). Den här minskningen syntes också vid oxidativ stress för de celler som behandlats med MG-132 (figur 7, buffert C, MG-132: 2, 3), vilket indikerar att minskningen i proteinnivåerna kvarstår trots att proteasomen är inhiberad. HSF1 och HSF2 nedregleras alltså inte via proteasomen vid oxidativ stress utgående från dessa resultat.

När cellerna istället lyserats med laemmlibuffert skedde inte samma minskning i proteinnivåerna för HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress (figur 7, Laemmli, MG-132: 2,3; DMSO), varken i kontrollen eller vid MG-132-behandling. En något lägre proteinnivå kan noteras för HSF1 vid MG-132-behandling och menadionbehandling (figur 7, Laemmli, MG-132: 3). Laemmlibufferten lyserar hela cellens innehåll, till skillnad från buffert C som extraherar cellens lösliga innehåll. På något sätt blir HSF1 och HSF2 mer olösliga vid oxidativ stress, så att de inte löser sig i buffert C.

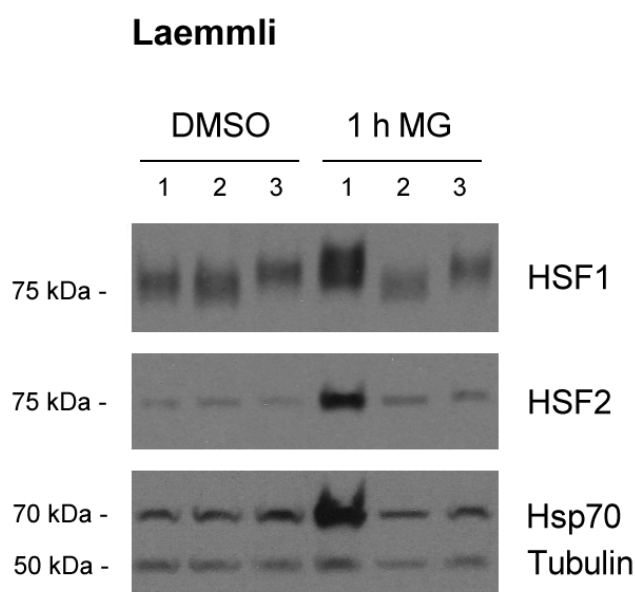
Överraskande nog inducerades inte Hsp70 vid MG-132-behandling och samtidig oxidativ stress (figur 7, MG-132, Hsp70: 2, 3), trots att det visats att MG-132 leder till aktivering av värmechockresponsen och induktion av Hsp70 (Bush et al., 1997). En ökning i proteinnivå för Hsp70 sker bara i det prov som behandlats endast med MG-132.



Figur 7. Western blot över relativa proteinnivåer av HSF1, HSF2 och Hsp70 (med tubulin som laddningskontroll) i K562-celler vid proteasominhibering och oxidativ stress. Proteasomens aktivitet inhiberades med MG-132, och i kontrollen tillsattes DMSO eftersom det används som förvaringsbuffert för MG-132. Behandlingarna verkade samtidigt som MG-132 och har namngetts enligt (1) kontroll, tre timmar etanolbehandling; (2) tre timmar 1 mM H₂O₂-behandling; (3) tre timmar 50 µM menadion-behandling (MD). Western blot kördes med celler lyserade i antingen buffert C eller laemmlibuffert. Antikroppar finns som bilaga.

Kombinerad proteasominhibering och behandling med oxidativ stress är en stor påfrestning för cellen. Därför undersöktes cellernas reaktion på upprepad stress med först proteasominhibering och sedan oxidativ stress. K562-celler behandlades först med MG-132, för att sedan tvättas och behandlas med oxidativ stress (H₂O₂ respektive menadion). Laemmlibuffert användes som lyseringsbuffert för att få med allt proteininnehåll från cellen. Western blot-analysen visade att oxidativ stress påverkar de relativa proteinnivåerna av HSF1, HSF2 och Hsp70 vid MG-132-behandling så att induceringen av dessa proteiner uteblir. Vid endast MG-132-behandling är de relativa proteinnivåerna av HSF1, HSF2 och Hsp70 höga (figur 8, 1 h MG: 1), medan de vid

påföljande oxidativ stress är låga (figur 8, 1 h MG: 2, 3). I enlighet med figur 7 kan induktionen av Hsp70 som orsakas av MG-132 (figur 8, 1h MG, 1) inte iaktas i de prov som behandlats med både MG-132 och oxidativ stress (figur 8, 1h MG: 2, 3). Enbart oxidativ stress förändrade inte cellens totala proteinnivåer av HSF1, HSF2 eller Hsp70 (figur 8, DMSO: 2, 3), vilket också observerats i figur 7. Tvärtemot det förväntade resultatet att proteasominhibering skulle leda till högre relativa proteinnivåer av HSF1 och HSF2, visar dessa resultat att kombinerad behandling med MG-132 och oxidativ stress inhiberar induktion av HSF1, HSF2 och Hsp70.

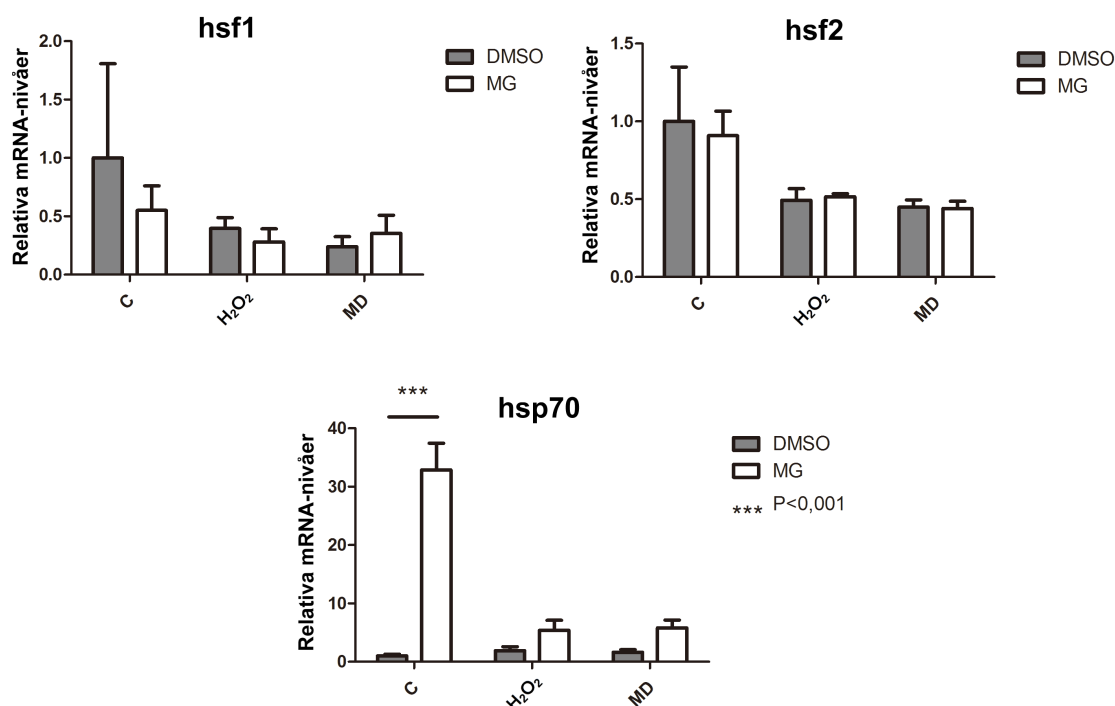


Figur 8. Western blot över relativa proteinnivåer av HSF1, HSF2 och Hsp70 (med tubulin som laddningskontroll) i K562-celler vid proteasominhibering och oxidativ stress. Proteasomens aktivitet inhiberades med MG-132 i en timme varefter cellerna tvättades och behandlades med 1mM H₂O₂ (2) respektive 50 µM menadion (3) i fem timmar. I kontrollen (1) tillsattes DMSO eftersom det används som förvaringsbuffert för MG-132. Western blot kördes med celler lyserade i laemmli. Antikroppar finns som bilaga.

5.2 Oxidativ stress påverkar induceringen av Hsp70-mRNA vid proteasominhibering

Då minskningen i HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress enligt ovanstående experiment inte berodde på nedreglering via proteasomen, utreddes möjligheten ifall det istället är mängden av HSF1-mRNA och HSF2-mRNA som minskar vid oxidativ stress och leder till lägre proteinnivåer. Därför undersöktes de relativa mRNA-nivåerna i K562-celler som behandlades med MG-132 och oxidativ stress. Cellernas mRNA-innehåll

kontrollerades med qRT-PCR, och resultaten normaliserades mot mängden GAPDH-mRNA. GAPDH är en så kallad hushållsgen och genuttrycket av GAPDH används därför här som baslinje.



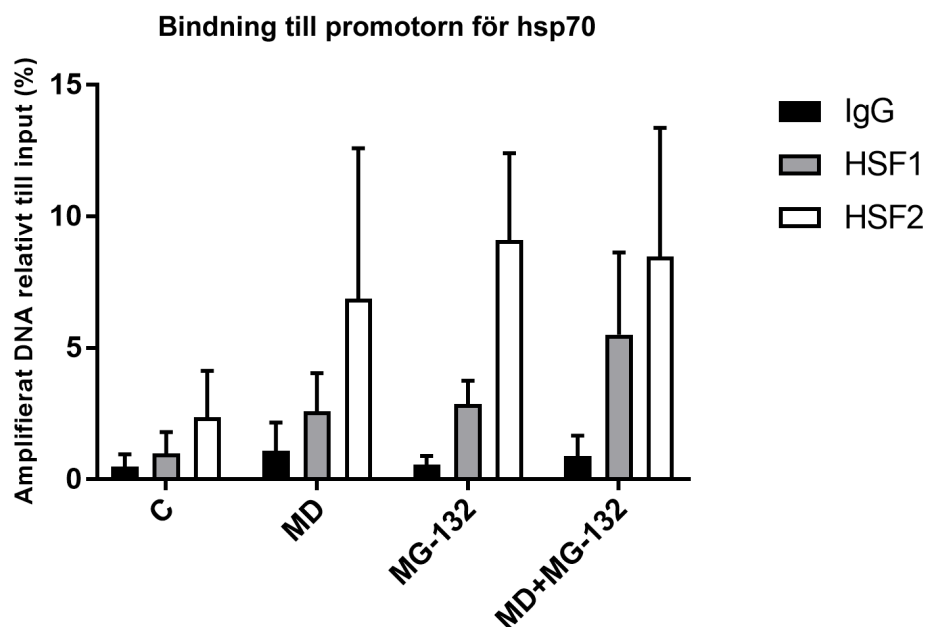
Figur 9. Relativa mRNA-nivåer av HSF1, HSF2 och Hsp70 vid behandling med MG-132 och oxidativ stress. K562-celler behandlades med DMSO (kontroll, C) eller 10 μ M MG-132 i en timme med påföljande tvätt och sedan 1mM H₂O₂ eller 50 μ M menadion (MD) i fem timmar. De relativa nivåerna av mRNA mättes med qRT-PCR (Taqman probe-baserad analys), och normaliserades mot mängden GAPDH-mRNA. Resultaten normaliserades mot GAPDH-mRNA i Microsoft Excel och analyserades i Prism (n=3).

De relativa mRNA-nivåerna av HSF1 och HSF2 visade inga signifikanta skillnader oberoende behandling (figur 9), men mRNA-nivåerna är nästan dubbelt så höga i kontrollen som vid oxidativ stress. Nivån av Hsp70-mRNA ökar signifikant (tvåvägs-ANOVA, Tukeys post hoc-test: $P<0,001$, $n=3$) vid MG-132-behandling jämfört med kontrollen, vilket betyder att Hsp70 induceras vid proteasominhibering. Då cellerna behandlats med både proteasom-inhibering och oxidativ stress uteblir denna Hsp70-induktion nästan helt (figur 9, Hsp70: H₂O₂ MG, MD MG), vilket också observerats i proteinnivåerna av Hsp70 i western blot-analyserna (figur 7, figur 8). Även om en signifikant skillnad kan observeras endast för uttrycket av Hsp70 mellan kontrollen och

behandling med MG-132 ($P < 0,001$, $n=3$), är mRNA-nivån av Hsp70 ungefär fyra gånger så hög vid enbart MG-132-behandling som vid kombinerad behandling med oxidativ stress och MG-132. Oxidativ stress inhiberar på något sätt induceringen av Hsp70 också på mRNA-nivå.

5.3 HSF1 och HSF2 binder promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering

Den inhiberade induktionen av Hsp70 på både protein- och mRNA-nivå vid kombinerad proteasominhibering och oxidativ stress ledde till att undersöka ifall bindningen av transkriptionsfaktorerna HSF1 och HSF2 till promotorn för Hsp70 påverkas vid oxidativ stress respektive kombinerad oxidativ stress och proteasominhibering. Bindningsgraden undersöktes med ChIP och resultaten normaliserades mot bindningsgraden av IgG, som här representerar baslinjen för ospecifik bindning. Med ChIP kan man analysera bindningen mellan reglerande proteiner och specifika promotorer på DNA i deras in vivo kromatinomgivning.



Figur 10. Kromatinimmunoprecipitering (ChIP) för bindningen av HSF1 och HSF2 till promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress respektive oxidativ stress och proteasominhibering. Cellerna behandlades först enligt följande: (C) kontroll, 2 μ l 100 % EtOH, 2 μ l DMSO; (MD) 50 μ M menadion och 2 μ l DMSO; (MG-132) 2 μ l 100% EtOH, 10 μ M MG-132; (MD+MG-132) 50 μ M menadion, 10 μ M MG-132. Alla behandlingar var 30 minuter vid 37 °C. ChIP gjordes med G-sefarpärlor och DNA-fragmenten amplifierades med qPCR (Taqman probe-baserad analys). Resultaten normaliserades mot input IgG i Microsoft Excel och analyserades i Prism ($n=3$). Antikroppar och prober finns som bilaga.

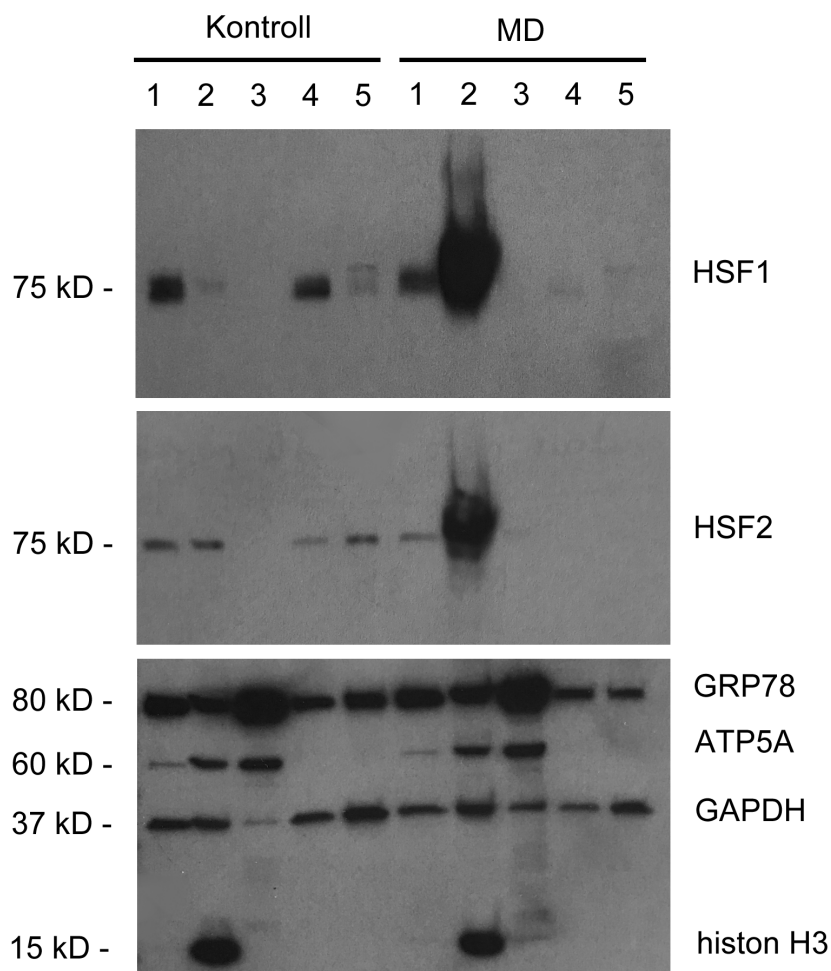
Inga signifikanta skillnader kunde observeras mellan behandlingarna eller variablerna (tvåvägs-ANOVA, Tukeys post hoc-test) (figur 10). Det lägsta p-värdena fanns för HSF2 mellan kontrollen och menadion-behandling (figur 10, HSF2: MD, $P=0,30$) och mellan kontrollen och MG-132-behandling (figur 10, HSF2: MG-132, $P=0,30$). Bindningen av HSF2 till promotorn för Hsp70 ökar tredubbelt vid stressinducerande behandlingar, men variationen inom samplet är genomgående stor och påverkar signifikansen. Både HSF1 och HSF2 binder alltså promotorn för Hsp70 vid kombinerad oxidativ och proteotoxisk stress (figur 10, MD+MG-132), vilket betyder att den låga mRNA-nivån av Hsp70 vid kombinerad behandling med MG-132 och oxidativ stress (figur 9) inte kan förklaras med en minskad bindning av HSF1 och HSF2 till promotorn för Hsp70.

5.4 HSF1 och HSF2 förflyttar sig till cellkärnan vid oxidativ stress

De låga relativa proteinnivåerna av HSF1 och HSF2 i K562-celler vid oxidativ stress (figur 7, figur 8) ledde till frågan om var HSF1 och HSF2 befinner sig intracellulärt vid detta stresstillstånd. Den intracellulära lokaliseringen av HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress (menadion) kontrollerades med hjälp av cellfraktionering, det vill säga särskiljning av cellens organeller enligt deras densitet. Cellerna delades upp i celllysat, cellkärnor, mitokondrier, cytoplasma/löslig fraktion och membraner/olöslig fraktion.

Western blot-analysen visade att både HSF1 och HSF2 ökar i relativ proteinnivå samt förflyttas till cellkärnan vid oxidativ stress (figur 10, MD: 2). I laddningskontrollen kan man se att histon H3 (markören för cellkärnor) endast återfinns i cellkärnsproven, vilket betyder att cellkärnorna separerats framgångsrikt från resten av cellen och att resultatet är trovärdigt. Som positiv kontroll för cellstress användes celler som behandlats med 42 °C värmechock i 30 minuter, och även vid denna stress förflyttades HSF1 och HSF2 till cellkärnan (visas inte i figuren), vilket överensstämmer med befintlig litteratur (Åkerfelt et al. 2010).

Cellfraktionering



Figur 11. Western blot över relativa proteinnivåer av HSF1 och HSF2 i fraktionerade K562-celler. Cellerna behandlades med 50 μ M menadion (MD) i tre timmar, kontrollen med 10 μ l etanol. Cellmembranen lyserades och organellerna separerades enligt fraktioneringsprotokollet. De separerade fraktionerna kördes i en Western blot-analys enligt: (1) celllysats, (2), cellkärnor, (3) mitokondrier, (4) cytosol och (5) membran. Laddningskontrollen för organellerna är GRP78 (endoplasmiskt reticulum, membraner), ATP5A (mitokondrier), GAPDH (cytosol), histon H3 (cellkärnan).

6 Diskussion

6.1 Oxidativ stress påverkar induceringen av Hsp70 vid proteotoxisk stress

Oxidativ stress aktiverar HSF1 och uttrycket av Hsp (Lee et al., 2000; Ahn & Thiele, 2003) och HSF1 är nödvändig för cellens överlevnad vid oxidativ stress (Kim et al., 2016). Även HSF2 deltar aktivt i värmechockresponsen och aktiveringen av transkriptionen av bland annat Hsp70 (Åkerfelt et al. 2010). Därför är det överraskande att se låga relativa proteinnivåer av HSF1 och HSF2 i K562-celler efter behandling med oxidativ stress (figur 8). Projektet inleddes med hypotesen att HSF1 och HSF2 nedregleras via proteasomen vid oxidativ stress. Det undersöktes med hjälp av proteasominhibitorn MG-132, och höga proteinnivåer förväntades ifall en nedreglering av HSF1 och HSF2 skedde vid oxidativ stress via proteasomen. Tvärtom gav detta experiment resultatet att proteinnivåerna var minst lika låga vid proteasominhibering och oxidativ stress som vid endast oxidativ stress. Behandling med endast MG-132 leder till inducering av HSF1, HSF2 och Hsp70 (figur 8), men när cellerna sedan behandlats ytterligare med oxidativ stress är proteinnivåerna av HSF1, HSF2 och Hsp70 överraskande låga. Värt att notera är den uteblivna induktionen av Hsp70 (figur 8) efter kombinerad MG-132-behandling och oxidativ stress, eftersom MG-132 borde öka uttrycket av Hsp-gener som till exempel Hsp70 (Bush et al., 1997). Däremot har det vistats tidigare att oxidativ stress har en inhiberande effekt på värmechockresponsen (Adachi et al., 2009) och specifikt genuttrycket av Hsp (Heine et al., 2008). Adachi et al. (2009) har visat att oxidativ stress inhiberar värmechockresponsen och uttrycket av Hsp70 till förmån för UPR (eng. unfolded protein response), eftersom ROS också bildas vid ER-stress. Det är möjligt att oxidativ stress hindrar värmechockresponsen så att cellen istället kan fokusera på UPR och proteinproduktion av dess målgener.

Western blot-analysen (figur 7) antyder också att lösligheten hos HSF1 och HSF2 påverkas av oxidativ stress. Analysen av samma prov som lyserats på två olika sätt, antingen med buffert C eller laemmlibuffert, visar att HSF1 och HSF2 vid oxidativ stress inte löser sig i buffert C, men nog finns kvar i samma mängd i cellen vilket syns i proven som lyserats i laemmlibuffert. Det är möjligt att HSF1 och HSF2 bildar olösliga

kromatinaggregat på grund av stressförhållandena. Western blot-resultaten hade kunnat kvantifieras för att erhålla tydligare resultat. Visuellt analys av Western blot-resultaten utan kvantifiering förlitar sig på ögats möjlighet att jämföra, medan en kvantifiering av resultaten ger underlag för statistisk jämförelse.

6.2 Inducering av Hsp70 påverkas vid proteasominhibering och oxidativ stress trots opåverkad bindning av HSF1 och HSF2 till DNA

Induceringen av HSF1, HSF2 och Hsp70 uteblir när cellerna behandlats med först oxidativ stress och sedan proteasominhibering (figur 8). Nedreglering av transkriptionen av mRNA är en möjlig förklaring för detta, och därför kontrollerades cellernas mRNA-mängder för HSF1, HSF2 och Hsp70 med qRT-PCR. Med den här metoden särskiljs dock inte ny transkription från färdiga transkript, utan resultaten visar cellens hela mRNA-pool. Resultaten visade inga signifikanta skillnader i mRNA-nivåerna för HSF1 och HSF2 (figur 9). HSF1 och HSF2 nedregleras alltså inte via sina mRNA-nivåer vid oxidativ stress. Däremot indikerar resultaten att Hsp70 nedregleras vid kombinerad stress, eftersom nivån av Hsp70-mRNA stiger signifikant vid MG-132-behandling, men inte om cellerna också behandlats med oxidativ stress. Den uteblivna induceringen av Hsp70 som observerats i föregående experiment kan relateras till denna uteblivna ökning av Hsp70-mRNA.

Den uteblivna induceringen av Hsp70 undersöktes med ChIP och kunde inte entydigt förklaras med minskad binding av HSF1 och HSF2 till promotorn för Hsp70, då inga signifikanta skillnader hittades i deras bindningsmönster. Även Adachi et al. (2009) har konstaterat att den uteblivna induceringen av Hsp70 efter oxidativ stress är oberoende av HSF1-bindningen till DNA. Bindningsmönstret för HSF2 skiljde sig mest från kontrollen (figur 10), kanske för att HSF2 påverkar induceringen av Hsp70 negativt som den gör i mitotiska celler (Elsing et al., 2014). Upprepningar av ChIP behövs för att ge tydlighet i frågan, då de upprepningar som gjorts (n=3) omfattar en stor variation bland resultaten mellan experimenten.

Den intracellulär lokaliseringen av HSF1 och HSF2 under oxidativ stress visade sig vara i cellkärnan som väntat (figur 11). Endast lokaliseringen säger dock inte så mycket om proteinernas funktion, och det är möjligt att HSF1 och HSF2 bildar olösliga kromatinaggregat i kärnan vid extrema förhållanden. Bindningen av HSF1 och HSF2 till åtminstone promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress påverkar möjligtvis värmechockfaktorernas löslighet och därmed deras synlighet i analyser som gjorts med buffert C. Separationen av fraktionen med cellkärnor var lyckad, vilket syns i kontrollen som är ren (histon H3 finns endast i fraktionen för cellkärnor), och den visuella analysen av Western blot-resultaten visar att HSF1 och HSF2 förflyttades helt till cellkärnan vid oxidativ stress.

6.3 Projektets begränsningar

Cellernas tillstånd vid skördeögonblicket är inte kontrollerat, och följaktligen är det inte nödvändigtvis så att proteininnehållet motsvarar det hos en cell som kan fortsätta leva. Hur mycket påverkas egentligen cellens återhämtningsmöjligheter av denna typ av direkt oxidativ stress under en längre tid? När även proteasominhibering introduceras blir frågan om cellerna ens är kapabla att utföra transkription och translation av nya proteiner i ett sådant stresstillstånd. Proteasominhibering gör att felveckade och färdigt nyttjade proteiner inte kan brytas ner utan blir kvar i cellen, vilket leder till proteotoxisk stress. Oxidativ stress å sin sida mimikerar följder av ER-stress och mitokondrieproblem, vilket kan trigga cellens svar på de här tillstånden (Adachi et al., 2009). Både ER-stress och mitokondrieproblem skapar ROS molekyler, som aktiverar till exempel UPR som leder till pausad translation av proteiner och, ifall cellens tillstånd inte förbättras, till apoptos.

Behandlingarna med oxidativ stress är mer svårkontrollerade än till exempel värmestress, där cellerna på ett kontrollerat sätt kan utsättas för värmestress under ett specifikt tidsintervall och stress-elementet sedan kan avlägsnas totalt. Efter tillsats av H₂O₂ eller menadion i cellernas tillväxtmedium är det inte möjligt att avlägsna alla rester av denna stress trots eventuell tvättning av cellerna. Speciellt H₂O₂ är väldigt fritt rörligt över cellmembranet och blir kvar inne i cellerna.

För att se effekterna av oxidativ stress och MG-132 på cellens mRNA- och proteinproduktion kunde till exempel metabolisk märkning (eng. metabolic labelling) användas. Med metabolisk märkning kan man åtskilja cellens nyproducerade RNA och proteiner, till exempel med 4-thiouridine och RNA-profilering, vilket kunde visa ifall produktionen av nytt mRNA eller protein minskar vid ovanstående stresstillstånd.

6.4 Sammanfattning

Oxidativ stress inhiberar värmechockresponsens inducering av Hsp70, orsakad av proteasominhibering, både på mRNA- och proteinnivå via en okänd mekanism. HSF1 och HSF2 binder promotorn för Hsp70 vid oxidativ stress och proteasominhibering, men varken mRNA eller Hsp70-protein produceras mer än normalt, vilket är överraskande. De oxidativa stressförhållandena är svåra att kontrollera och bidrar därför till att resultaten inte är definitiva. Utgående från den här avhandlingen kunde vidare undersökningar fokusera på dynamiken kring utebliven induktion av Hsp70 vid oxidativ stress. Andra cellinjer kunde användas för att se om de ger samma resultat och andra inducerare av oxidativ stress kunde användas för att se om de orsakar samma fenomen, och samtidigt kontrollera uttrycket av UPR-gener. Det kunde också kontrolleras ifall HSF2 är extra viktig för värmechockresponsens transkription under oxidativ stress, eller tvärtom den inhiberande parten vid dessa förhållanden.

Oxidativ stress är ospecifikt och därför svårt att använda terapeutiskt, men de effekter som oxidativ stress har för cellen och organismen är trots det viktiga att undersöka. Oxidativ stress är kopplat till livets stora fråga: åldrande, och värmechockresponsen är viktig för organismens överlevnad och anpassning. Att ta reda på hur dessa samverkar kunde fördjupa kunskapen om sambandet mellan stress och åldrande, samt belysa faktorer som utlöser åldersrelaterade sjukdomar.

Tillkännagivanden

Jag vill tacka Lea Sistonen för att jag fick göra min pro gradu-avhandling i hennes forskningsgrupp, samt för all tålmodig handledning och hjälp. Jag vill också rikta ett stort tack till Samu Himanen för handledning med allt praktiskt arbete och textrespons. Hela Leas forskningsgrupp har hjälpt mig på olika sätt, tack till Jenny, Alejandro, Marek, Jens, Mikael, Alexandra och Eva. Ett speciellt tack till Cynthia Swan som lärde mig fraktionering. Tack till mina studiekompisar Christa och Calle som läst och gett respons på min text. Tack till Lunchkaffegruppen för gradupepp och sällskap! Till sist vill jag tacka min man, mina barn och min familj som motiverat mig till att göra det här projektet färdigt.

7 Referenser

- Adachi, M., Liu, Y., Fujii, K., Calderwood, S. K., Nakai, A., Imai, K., & Shinomura, Y. (2009). Oxidative stress impairs the heat stress response and delays unfolded protein recovery. *PloS one*, 4(11)
- Ahn, S-G & Thiele, D.J. (2003) Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev* 17: 516–528
- Ananthan, J., Goldberg, A. L., & Voellmy, R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 232(4749), 522-524
- Anisimov, V. N., Egorov, M. V., Krasilshchikova, M. S., Lyamzaev, K. G., Manskikh, V. N., Moshkin, M. P., Novikov, E.A., Popovich, I.G., Rogovin, K.A., Shabalina, I.G., Sherakova, O.N., Skulachev, M.V., Titova, T.V., Vygodin, V.A., Vyssokikh, M.Y., Yurova, M.N., Zabezhinsky, M.A. & Skulachev, V.P. (2011). Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany NY)*, 3(11), 1110
- Alliangana, D. M. (1996). Effects of beta-carotene, flavonoid quercetin and quinacrine on cell proliferation and lipid peroxidation breakdown products in BHK-21 cells. *East African medical journal*, 73(11), 752-757
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 272(1):217-21
- Batulan, Z, Shinder, G.A., Minotti, S., He, B.P., Doroudchi, M.M., Nalbantoglu, J., Strong, M.J., Durham, H.D. (2003) High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1. *J. Neurosci.*, 23 pp. 5789-5798
- Bierkamp, C., Luxey, M., Metchat, A., Audouard, C., Dumollard, R., Christians, E. (2010) Lack of maternal Heat Shock Factor 1 results in multiple cellular and developmental defects, including mitochondrial damage and altered redox homeostasis, and leads to reduced survival of mammalian oocytes and embryos. *Dev Bio* 339: 338-353
- Björk, J. K., Sandqvist, A., Elsing, A. N., Kotaja, N., & Sistonen, L. (2010). miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. *Development*, 137(19), 3177-3184
- Björk, J. K., & Sistonen, L. (2010). Regulation of the members of the mammalian heat shock factor family. *The FEBS journal*, 277(20), 4126-4139
- Björk, J. K., Åkerfelt, M., Joutsen, J., Puustinen, M. C., Cheng, F., Sistonen, L., & Nees, M. (2016). Heat-shock factor 2 is a suppressor of prostate cancer invasion. *Oncogene*, 35(14), 1770
- Budzyński, M. A., Puustinen, M. C., Joutsen, J., & Sistonen, L. (2015). Uncoupling stress-inducible phosphorylation of heat shock factor 1 from its activation. *Molecular and cellular biology*, 35(14), 2530-2540
- Bush, K.T., Goldberg, A.L. & Nigam, S.K. (1997). Proteasome Inhibition Leads to a Heat-shock Response, Induction of Endoplasmic Reticulum Chaperones, and Thermotolerance. *J. Biol. Chem.* 272: 90869092.
- Carri, M. T., Valle, C., Bozzo, F., & Cozzolino, M. (2015). Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 41
- Chen, Y., Azad, M.B. & Gibson, S.B. (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* 16:1040-1052

- Choi, Y.-J., Om, J.-Y., Kim, N.-H., Chang, J.-E., Park, J.H., Kim, J.-Y., Lee, H.J., Kim, S.-S., Chun, W. (2013) Heat shock transcription factor-1 suppresses apoptotic cell death and ROS generation in 3-nitropropionic acid-stimulated striatal cells. *Mol Cell Biochem* 375: 59-67
- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Höhfeld, J., & Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature cell biology*, 3(1), 93
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann. Int. Med.* 107: 526–545
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B., & Lindquist, S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell*, 130(6), 1005-1018
- Dai, D. F., Chiao, Y. A., Marcinek, D. J., Szeto, H. H., & Rabinovitch, P. S. (2014). Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longevity & healthspan*, 3(1), 6
- D’amico, E., Factor-Litvak, P., Santella, R. M., & Mitsumoto, H. (2013). Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free radical biology and medicine*, 65, 509-527
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3(4), 461-491
- D'Souza, R. J., Phillips, H. M., Jones, P. W., Strange, R. C., & Aber, G. M. (1993). Interactions of hydrogen peroxide with interleukin-6 and platelet-derived growth factor in determining mesangial cell growth: effect of repeated oxidant stress. *Clinical Science*, 85(6), 747-751
- Elsing, A. N., Aspelin, C., Björk, J. K., Bergman, H. A., Himanen, S. V., Kallio, M. J., ... & Sistonen, L. (2014). Expression of HSF2 decreases in mitosis to enable stress-inducible transcription and cell survival. *Journal of Cell Biology*, 206(6), 735-749
- Fahn, S., Sulzer, D. (2004) Neurogeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *Neuro Rx*. 1:139-154
- Gidalevitz, T., Prahlad, V., & Morimoto, R. I. (2011). The stress of protein misfolding: from single cells to multicellular organisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(6), a009704
- Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E. T., Neef, D. W., Jaeger, A. M., Cabisco, E., McKinstry, S. U., Doss, A., Aballay, A., Lo, D. C., Akimov, S. S., Ross, C. A., Eroglu, C. and Thiele, D. J. (2017). Abnormal Degradation of the Neuronal Stress-protective Transcription Factor HSF1 in Huntington’s Disease. *Nat. Commun.* 8, 14405
- Halliwell, B. & Gutteridge J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14
- Halprin, K. M., & Ohkawara, A. (1967). The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase. *J Invest Dermatol*, 48(2), 149-52
- Harman, D. (2002). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science's SAGE KE*, 2002(37), 14
- Hendriks, I. A., Lyon, D., Young, C., Jensen, L. J., Vertegaal, A. C. O. and Nielsen, M. L. (2017). Site-specific Mapping of the Human SUMO Proteome Reveals Co-modification with Phosphorylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 325–336

- Heydari, A. R., You, S., Takahashi, R., Gutschmann, A., Sarge, K. D., & Richardson, A. (1996). Effect of caloric restriction on the expression of heat shock protein 70 and the activation of heat shock transcription factor 1. *Developmental genetics*, 18(2), 114-124
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A. and Sistonen, L. (2006). PDSM, a Motif for Phosphorylation-dependent SUMO Modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 45–50
- Homma, S., Jin, X., Wang, G., Tu, N., Min, J., Yanasak, N., & Mivechi, N. F. (2007). Demyelination, astrogliosis, and accumulation of ubiquitinated proteins, hallmarks of CNS disease in hsf1-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 27(30), 7974-7986
- Hsu, A. L., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, 300(5622), 1142-1145
- Iguchi, Y., Katsuno, M., Niwa, J. I., Takagi, S., Ishigaki, S., Ikenaka, K., ... & Misawa, H. (2013). Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*, 136(5), 1371-1382
- Jaeger, A.M., Pemble, C.W. 4th, Sistonen, L., Thiele, D.J. (2016) Structures of HSF2 reveal mechanisms for differential regulation of human heat-shock factors. *Nat Struct Mol Biol.* 23(2):147-54
- Jaquier-Sarlin, M.R. & Polla, B.S (1996) Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA- binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem. J.* 318:187-193
- Jedlicka, P., Mortin, M. A., & Wu, C. (1997). Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *The EMBO journal*, 16(9), 2452-2462
- Jones, D.P., Go, Y.M. (2010) Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab.* 12 (Suppl 2):116-125
- Kaeberlein, M., McVey, M., & Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development*, 13(19), 2570-2580
- Kim, H. Y., Kim, Y. S., Yun, H. H., Im, C. N., Ko, J. H., & Lee, J. H. (2016). ERK-mediated phosphorylation of BIS regulates nuclear translocation of HSF1 under oxidative stress. *Experimental & molecular medicine*, 48(9), e260
- Klaus, V.; Hartmann, T.; Gambini, J.; Graf, P.; Stahl, W.; Hartwig, A.; Klotz, L.O. 1,4 Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 496, 93–100
- Klein, E., Vánky, F., Ben-Bassat, H., Neumann, H., Ralph, J.Z., Polliack, A. (1976) Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Canc.* 18(4):421-431
- Kumar, M.J., Andersen, J.K. (2004) Perspectives on MAO-B in ageing and neurological disease - where do we go from here? *Mol Neurobiol.* 30:77-89
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual review of biochemistry*, 84, 435-464
- Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R., Rhee, S.G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273:15366-15372
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G. (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 277:20336-20342

- Lin, M.T., Beal, M.F., (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 443:787-795
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 1151-1191
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677
- Lis, J.T., Mason, P., Peng, J., Price, D. H., Werner, J. (2000) P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev*. 14(7): 792-803
- Liu, X.D. & Thiele, D.J. (1996) Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev*. 10:592-603
- Liu, X.D., Liu, P.C.C., Santoro, N., Thiele, D.J. (1997) Conservation of a stress response: human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast HSF. *EMBO J*. 16 (21): 6466-6477
- Mathew, A., Mathur, S. K., & Morimoto, R. I. (1998). Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), 5091-5098
- Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J., & Jolly, C. (2004). A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *Journal of cell science*, 117(19), 4551-4558
- Min, J. N., Huang, L., Zimonjic, D. B., Moskophidis, D., & Mivechi, N. F. (2007). Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene*, 26(35), 5086
- Morimoto, R.I. (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev*. 22: 1427–1438
- Morimoto, R.I. (2011) The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in ageing and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 76: 91-99
- Munoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I., Segura-Aguilar, J. (2012) Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Di*. 2012:920953
- Murphy, M.P. (2012) Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signalling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxid. Redox Signal*. 16:476-495
- Neef, D. W., Jaeger, A. M., & Thiele, D. J. (2011). Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 10(12), 930
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A., & Scharf, K. D. (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell stress & chaperones*, 6(3), 177
- Parker, C. S., & Topol, J. (1984). A Drosophila RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an Hsp 70 gene. *Cell*, 37(1), 273-283
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual review of biochemistry*, 78, 959-991

- Pratt, W. B., & Toft, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine*, 228(2), 111-133
- Qian, S. B., Zhang, X., Sun, J., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., & Patterson, C. (2010). mTORC1 links protein quality and quantity control by sensing chaperone availability. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27385-27395
- Rahman, S., & Islam, R. (2011). Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 11
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603-1616
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571-573
- Rothstein, J. D., Bristol, L. A., Hosler, B., Brown, R. H., & Kuncl, R. W. (1994). Chronic inhibiting of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4155-4159
- Sandqvist, A., Björk, J.K., Akerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., Jolly, C., Salminen, T.A., Nymalm, Y., Sistonen, L. (2009) Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol Biol Cell*. Mar;20(5):1340-7
- Santagata, S., Hu, R., Lin, N. U., Mendillo, M. L., Collins, L. C., Hankinson, S. E., ... & Ince, T. A. (2011). High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18378-18383
- Santos, S. D., & Saraiva, M. J. (2004). Enlarged ventricles, astrogliosis and neurodegeneration in heat shock factor 1 null mouse brain. *Neuroscience*, 126(3), 657-663
- Schieber, M. & Chandel, N.S. (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Bio*. 24: R453- R462
- Shalgi, R., Hurt, J. A., Lindquist, S., & Burge, C. B. (2014). Widespread inhibiting of posttranscriptional splicing shapes the cellular transcriptome following heat shock. *Cell reports*, 7(5), 1362-1370
- Shi, Y., Mosser, D. D., & Morimoto, R. I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes & development*, 12(5), 654-666
- Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., ... & Wallace, D. C. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *science*, 308(5730), 1909-1911
- Song, J., Takeda, M., & Morimoto, R. I. (2001). Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nature cell biology*, 3(3), 276
- Sundaresan, M., Yu, Z., Ferrans, V., Irani, K., Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 270:296-299
- Takaki, E., Fujimoto, M., Sugahara, K., Nakahari, T., Yonemura, S., Tanaka, Y., ... & Nakai, A. (2006). Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4931-4937

- Theodorakis, N. G., & Morimoto, R. I. (1987). Posttranscriptional regulation of Hsp70 expression in human cells: effects of heat shock, inhibiting of protein synthesis, and adenovirus infection on translation and mRNA stability. *Molecular and cellular biology*, 7(12), 4357-4368
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H.T. & Larsson, N-G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429(6990), 417
- Trott, A., West, J. D., Klaić, L., Westerheide, S. D., Silverman, R. B., Morimoto, R. I., & Morano, K. A. (2008). Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. *Molecular biology of the cell*, 19(3), 1104-1112
- Vargas, M. R., Johnson, D. A., & Johnson, J. A. (2011). Decreased glutathione accelerates neurological deficit and mitochondrial pathology in familial ALS-linked hSOD1G93A mice model. *Neurobiology of disease*, 43(3), 543-551
- Vihervaara, A., Sergelius, C., Vasara J., Blom, M.A., Elsing, A.N., Roos-Mattjus, P., Sistonen, L. (2013) Transcriptional response to stress in the dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(36): E3388-97
- Vihervaara, A. & Sistonen, L. (2014) HSF1 at a glance. *J Cell Sci* 127:261-266
- Voellmy, R., & Boellmann, F. (2007). Chaperone regulation of the heat shock protein response. In *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks* (pp. 89-99). Springer, New York, NY
- Wang, G., Zhang, J., Moskophidis, D., Mivechi, N.F. (2003) Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genesis*. 36(1):48-61
- Weiduschat, N., Mao, X., Hupf, J., Armstrong, N., Kang, G., Lange, D. J., ... & Shungu, D. C. (2014). Motor cortex glutathione deficit in ALS measured in vivo with the J-editing technique. *Neuroscience letters*, 570, 102-107
- Westerheide, S. D., Anckar, J., Stevens, S. M., Sistonen, L., & Morimoto, R. I. (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*, 323(5917), 1063-1066
- Wu, C. (1984). Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature*, 311(5981), 81
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual review of cell and developmental biology*, 11(1), 441-469
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A. A., McMillan, D. R., Curry, B. B., Richardson, J. A., & Benjamin, I. J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *The EMBO journal*, 18(21), 5943-5952
- Yan, L-J., Christians, E.S., Liu, L., Xiao, XZ., Sohal, R.S., Benjamin, I.J. (2002) Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *EMBO J*. 21(19):5164-5172
- Zimarino, V., & Wu, C. (1987). Induction of sequence-specific binding of *Drosophila* heat shock activator protein without protein synthesis. *Nature*, 327(6124), 727

- Zhang, L., Jiang, H., Gao, X., Zou, Y., Liu, M., Liang, Y., Yu, Y., Zhu, W., Chen, H., Ge, J. (2011) Heat shock transcription factor-1 inhibits H₂O₂-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 347: 21-28
- Zheng, X., Krakowiak, J., Patel, N., Beyzavi, A., Ezike, J., Khalil, A. S., & Pincus, D. (2016). Dynamic control of Hsf1 during heat shock by a chaperone switch and phosphorylation. *Elife*, 5, e18638
- Åkerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V., Sistonen, L. (2007) Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann N Y Acad Sci.* 1113:15-27
- Åkerfelt, M., Henriksson, E., Laiho, A., Vihervaara, A., Rautoma, K., Kotaja, N., Sistonen, L. (2008) promoter ChIP- chio ananalysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(32):11224-9
- Åkerfelt, M., Morimoto, R.I. & Sistonen, L. (2010) Heat shock factors: Integrators of cell stress, development, and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 545–555
- Östling, P., Björk, J.K, Roos-Mattjus, P., Mezger, V., Sistonen, L. (2007) Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of Hsp genes through intrplay with HSF1. *J Biol Chem.* 282(10):7077-86

Appendix I - Recept

Laemmli-lyseringsbuffert

62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8); 25% glycerol;
2% SDS;
0.01% Bromophenol Blue; 710 mM β -
merkaptoetanol

Semi dry transferbuffert

3/5 mQ-vatten, 1/5 semidry transferbuffert,
1/5 metanol

11 % formaldehyd

11% formaldehyd; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA
(pH 8); 0,5 mM EGTA (pH 8); 50mM
HEPES (pH 8)

Joosts-lyseringsbuffert

1 % SDS; 10 mM EDTA (pH 8); 50 mM
Tris-HCl (pH 8); proteasinhäbitorer

ChIP-buffert

150 mM NaCl; 20mM Tris- HCl (pH 8); 1 %
Triton-X; proteasinhäbitorer

ChIP-tvättbuffert 1

0.1 % SDS; 1 % Triton-X; 2 mM EDTA (pH
8); 150 mM NaCl)

ChIP- tvättbuffert 2

0.1 % SDS; 1 % Triton-X; 2 mM EDTA (pH
8); 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl

ChIP-tvättbuffert 3

2 mM EDTA (pH 8); 20 mM Tris-HCl (pH
8); 10 % glycerol

TE-buffert

10 mM Tris-HCl (pH 8); 1mM EDTA (pH 8)

10x hypoton buffert

200 mM HEPES (pH 7,8); 50 mM KCl;
15 mM MgCl₂

1x hypoton buffert

1x hypoton buffert; 50 mg/ml delipitated
BSA; 100 mM PMSF; 1 M DTT; Roche
protease inhibitor tablet (05 892 791 001)

2,5x MSH-buffert (stock)

525 mM mannitol; 175 mM sucrose; 50 mM
HEPES (pH 7,8); 5 mM EDTA

2,5x MSH-buffert

525 mM mannitol; 175 mM sucrose; 50 mM
HEPES (pH 7,8); 5 mM EDTA; 50 mg/ml
delipitated BSA; 100 mM PMSF; 1 M DTT;
Roche protease inhibitor tablet (05 892 791
001)

Tvättbuffert för cellkärnor

1x hypoton buffert; 1x MSH-buffert; 100
mM PMSF; 1 M DTT; Roche protease
inhibitor tablet (05 892 791 001)

Förvaringsbuffert

1x hypoton buffert; 1x MSH-buffert; 25%
glycerol

Tvättbuffert för mitokondrier

1x MSH-buffert; 100 mM PMSF; 1 M DTT;
Roche protease inhibitor tablet (05 892 791
001)

Appendix II - Antikroppar

<i>Primär antikropp</i>	<i>Utspädning</i>	<i>Sekundär antikropp</i>	<i>Utspädning</i>	<i>Användning</i>	<i>Tillverkare</i>
HSF1 Ab4	1:1000	anti råtta	1:5000	Western blotting	Thermo Scientific
HSF1 SPA-901	-	-	-	ChIP	Enzo Life Sciences
HSF2 3E2	1:500	anti råtta	1:5000	Western blotting	Santa Cruz Biotechnology
HSF2	-	-	-	ChIP	Östling et al., 2007
hsp70 SPA-810	1:10 000	anti mus	1:10 000	Western blotting	Enzo Life Sciences
tubulin	1:20 000	anti mus	1:10 000	Western blotting	-
Membrane fraction WB cocktail	1:500	Membrane fraction WB cocktail	1:5000	Western blotting	Abcam

Appendix III - Primers och prober för qPCR och ChIP

hHsp70 Fwd	GCC GAG AAG GAC GAC TTT GA
hHsp70 Rev	CCT GGT ACA GTC CGC TGA TGA
hHsp70 probe	Fam-TTA CAC ACC TGC TCC AGC TCC TTC CTC TT-BHQ1
HSF1 F	CAA GCT GTG GAC CCT CGT
HSF1 R	TCG AAC ACG TGG AAG CTG T
probe	67 (universal probe library)
HSF2 F	GGAGGAAACCCACACTAACG
HSF2 R	ATCGTTGCTCATCCAAGACC
probe	36 (universal probe library)
GAPDH F	GTTCGACAGTCAGCCGCATC
GAPDH R	GGAATTTGCCATGGGTGGA
GAPDH probe	FAM-ACCAGGCGCCCAATACGACCAA-TAMRA
hHSP70 prom F	CTG GCC TCT GAT TGG TCC AA
hHSP70 prom R	CAC GGA GAC CCG CCT TTT
hHSP70 prom probe	Fam-CGG GAG GCG AAA CCC CTG GAA-BHQ1